

Expressão diferencial dos recetores A_1 e A_{2A} da adenosina no hipocampo de doentes com epilepsia mesial temporal (MTLE)

Marina Raquel Henriques Mendes

Mestrado em Bioquímica

Departamento de Química e Bioquímica

2012

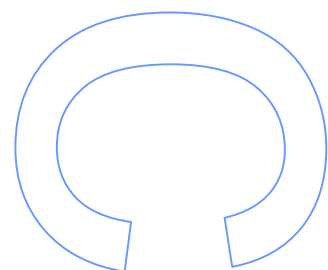
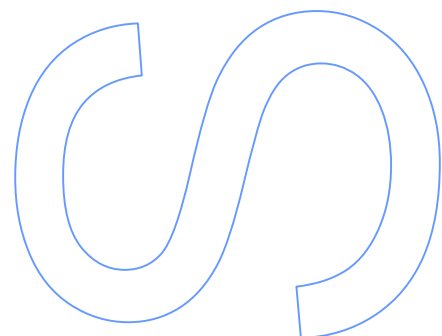
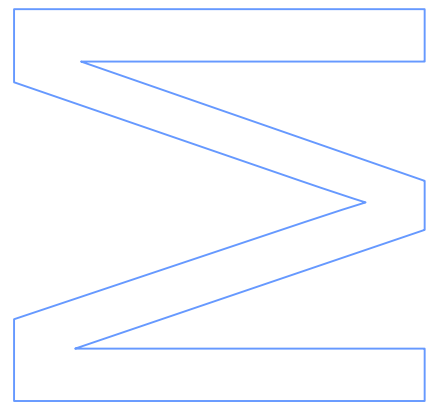
Orientador

Doutora Fátima Ferreirinha, Técnica Superior, ICBAS

Coorientador

Professor Doutor Paulo Correia-de-Sá, Professor Catedrático, ICBAS

Doutor Miguel Cordeiro, Investigador, ICBAS

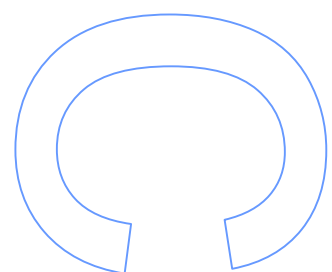
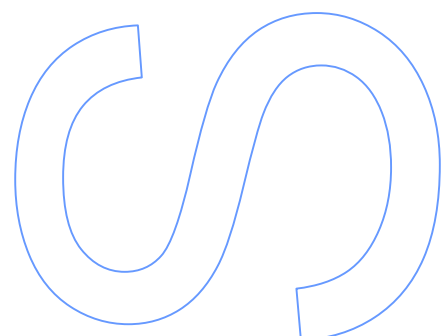
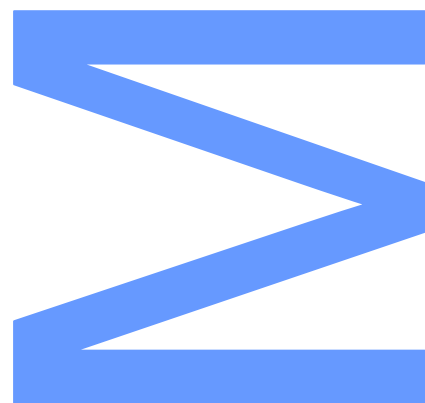




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



AGRADECIMENTOS

Gostaria em primeiro lugar de agradecer ao Professor Doutor Paulo Correia-de-Sá por me ter dado a oportunidade de realizar este trabalho no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS e por todo o conhecimento transmitido ao longo do ano.

À Doutora Fátima Ferreirinha pela sua zelosa orientação, simpatia e apoio imprescindível, porque sem ela este trabalho não seria hoje uma realidade.

A toda a equipa do Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS, pela boa disposição, pelos bons momentos, pela partilha científica e por me terem recebido tão bem.

Muito obrigada a todos aqueles que me apoiaram ao longo do ano e sobretudo na reta final deste trabalho, com especial agradecimento aos colegas e amigos Bruno Bragança e Sónia Gomes.

Aos meus pais, ao meu namorado António e a todos os amigos que me são mais próximos por toda a motivação e carinho que me deram e assim me ajudaram a percorrer e concluir este percurso.

À FCT, à Liga Portuguesa contra a Epilepsia, à Universidade do Porto e ao Banco *Santander Totta* pelo financiamento, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

RESUMO

A adenosina é considerada um neuromodulador, influenciando a atividade neuronal atuando pré-sinápticamente, controlando a libertação de neurotransmissores, pós-sinápticamente, hiperpolarizando ou despolarizando os neurónios, e mesmo afetando a atividade extrasináptica das células gliais (Boison *et al*, 2010) .

O impacto da adenosina nas funções cerebrais parece dever-se às suas ações sobre os recetores de elevada afinidade para o nucleósido, A_1 e A_{2A} (Fredholm *et al*, 2005a). O principal efeito da adenosina sobre o sistema nervoso central envolve a ativação de recetores inibitórios do subtipo A_1 , que reduzem a libertação de neurotransmissores, como o glutamato, e diminuem a excitabilidade neuronal através da hiperpolarização pós-sináptica (Dunwiddie & Masino, 2001; Fredholm *et al*, 2005a). A ativação dos recetores facilitatórios A_{2A} contraria a ação dos recetores A_1 promovendo a libertação de neurotransmissores (Ciruela *et al*, 2006; Fredholm *et al*, 2005b). Desta forma, ativando recetores com efeitos opostos sobre a excitabilidade neuronal, a adenosina posiciona-se como uma molécula capaz de regular de forma fina fenómenos excitatórios e inibitórios no sistema nervoso central adaptando-os à atividade das células.

Em estudos funcionais realizados no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS-UP observou-se a existência de um desequilíbrio entre a atividade dos recetores inibitórios A_1 e facilitatórios A_{2A} no hipocampo de doentes com epilepsia do lobo temporal mesial (MTLE) quando comparado com amostras de cadáveres autopsiados por razões médico-legais.

Tendo em conta que a adenosina tem sido considerada um importante antiepilético endógeno, o presente trabalho teve como principal objetivo investigar a expressão dos recetores A_1 e A_{2A} da adenosina em várias regiões do hipocampo de doentes com epilepsia do tipo MTLE fármaco-resistente comparativamente com cadáveres sujeitos a autópsias-médico legais (controlos) por imunofluorescência aplicada à microscopia confocal. A avaliação quantitativa da expressão desses recetores foi realizada em lisados totais e terminais nervosos (sinaptossomas) isolados da mesma região pela técnica de *Western Blotting*.

A análise dos níveis de expressão do recetor A_1 por *Western blotting* sugere a existência de uma redução da densidade deste recetor no hipocampo de doentes MTLE comparativamente aos indivíduos controlo. Este fato, por si só, pode justificar a ocorrência de fenómenos de hiperexcitabilidade neuronal nos doentes. Relativamente aos recetores do subtipo A_{2A} , observou-se um aumento significativo da sua expressão no hipocampo dos doentes MTLE. Este aumento deve-se sobretudo à expressão destes recetores em populações celulares não-neuronais, já que o aumento foi

proporcionalmente maior em lisados totais do hipocampo dos doentes MTLE do que em terminais nervosos isolados (sinaptosomas). Estes resultados foram confirmados em estudos de imunofluorescência aplicada à microscopia confocal. Os ensaios de imunolocalização sugerem que o recetor A_1 se encontra tanto nos astrócitos (GFAP-positivos) como nos terminais nervosos do hipocampo. Já o recetor A_{2A} localiza-se predominantemente nos astrócitos hipocampais; o aumento da expressão destes recetores correlaciona-se positivamente com a intensa astrogliose característica dos doentes com epilepsia do tipo MTLE.

ABSTRACT

Adenosine is considered a neuromodulator influencing neuronal activity acting pre-synaptically, by controlling neurotransmitter release, postsynaptically, depolarizing or hyperpolarizing neurons, and even extrasynaptically affecting the activity of glial cells (Boison *et al*, 2010).

The impact of adenosine in brain function appears to be due to its action on high affinity receptors for the nucleoside, A₁ and A_{2A} (Fredholm *et al*, 2005a). The main effect of adenosine on the central nervous system involves the activation of subtype A₁ inhibitory receptors that reduce the release of neurotransmitters such as glutamate and decrease neuronal excitability via postsynaptic hyperpolarization (Dunwiddie & Masino, 2001; Fredholm *et al*, 2005a). The activation of facilitatory A_{2A} receptors contradicts the action of A₁ receptors promoting the release of neurotransmitters (Ciruela *et al*, 2006; Fredholm *et al*, 2005b). Thus, activating receptors with opposite effects on neuronal excitability, adenosine is positioned as a molecule capable of regulating excitatory and inhibitory phenomena in central nervous system adapted them to the activity of the cells.

Functional studies performed in the Laboratory of Pharmacology and Neurobiology ICBAS-UP demonstrated that there is an imbalance between the activity of inhibitory A₁ and facilitatory A_{2A} receptors in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) when compared to corpses subjected to medico-legal autopsies.

Given that adenosine has been considered an important endogenous antiepileptic, the present study aimed to investigate the expression of A₁ and A_{2A} adenosine receptors in various regions of the hippocampus of patients with drug-resistant MTLE epilepsy when compared with samples from corpses subjected to medico-legal autopsies (controls) by immunofluorescence applied to confocal microscopy. Quantitative expression evaluation of these receptors was performed on total lysates and nerve terminals (synaptosomes) isolated from the same region by the Western blotting technique.

Analysis of A₁ receptors expression levels by Western blotting suggests the existence of a reduction of this receptor in the hippocampus of patients with MTLE when compared to control subjects. This fact, by itself, can justify the occurrence of neuronal hyperexcitability phenomena in those patients. Regarding A_{2A} receptor subtype, there was a significant increase of its expression in the hippocampus of patients with MTLE. This increase is mainly due to the expression of these receptors in non-neuronal cell populations, since the increase was proportionately larger in total lysates of hippocampus from patients with MTLE than in isolated nerve terminals (synaptosomes). These results were confirmed by immunofluorescence studies applied to confocal microscopy. Immunolocalization assays suggest that the A₁ receptor is found in both astrocytes

(GFAP-positive) as in nerve terminals in the hippocampus. On the other hand the A_{2A} receptors are located predominantly in hippocampal astrocytes; increased expression of these receptors correlates positively with the intense astrogliosis characteristic of patients with MTLE epilepsy.

ÍNDICE

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iv
Lista de figuras e de tabelas	viii
Lista de abreviaturas	ix
I – Introdução	1
1.1 – A epilepsia	1
1.2 – A epilepsia do lobo mesial temporal (MTLE)	2
1.3 – A adenosina	4
1.3.1 – Recetores da adenosina no cérebro	6
1.4 – A epilepsia e a adenosina	10
1.5 – Papel dos astrócitos na epilepsia	12
1.6 – Aplicações terapêuticas baseadas na sinalização pela adenosina na epilepsia	13
Objetivos	15
II – Materiais e Métodos	16
2.1 – Descrição metodológica da obtenção e manuseamento dos tecidos	16
2.1.1 - Tecido cerebral de pacientes com epilepsia MTLE	16
2.1.2 - Tecido de cadáver humano proveniente de autópsias médico-legais	16
2.2 – <i>Western Blotting</i> (WB)	17
2.2.1 – Preparação das amostras	17
2.2.1.1 – Homogeneização das amostras	17
2.2.1.2 – Preparação dos sinaptossomas	17
2.2.1.3 – Quantificação de proteína	18
2.2.1.4 – Lise das amostras de tecido e sinaptossomas humanos	18
2.2.2 – SDS-PAGE	18
2.2.3 – Transferência de proteínas	19
2.2.4 – Detecção imunológica das proteínas	19
2.2.5 – Análise densitométrica	21
2.2.6 – Validação dos sinaptossomas como modelo experimental	21
2.3 - Imunolocalização por microscopia confocal	22
2.3.1 – Preparação dos tecidos	22
2.3.1.1 - Fixação e Preservação dos tecidos	22
2.3.1.2 - Seccionamento	23
2.3.1.3 – Tratamento com Negro de Sudão B	23

2.3.2 - Bloqueio e permeabilização.....	23
2.3.3 - Marcação com anticorpos.....	24
2.3.3.1 - Incubação com anticorpos primários.....	25
2.3.3.2 - Incubação com anticorpos secundários.....	25
2.3.4 - Microscopia confocal	26
III – Resultados e Discussão	28
3.1 – Identificação das diversas regiões do hipocampo humano	28
3.2 – Padrão anatomopatológico do hipocampo de doentes com MTLE: esclerose hipocampal.....	29
3.3 – Expressão e localização dos recetores A_1 e A_{2A} da adenosina no hipocampo de indivíduos controlo e de doentes com MTLE	30
3.3.1 – Recetor A_1	30
3.3.1.1 – Análise da expressão proteica	30
3.3.1.2 – Imunolocalização por microscopia confocal	31
3.3.2 – Recetor A_{2A}	34
3.3.2.1 – Análise da expressão proteica	34
3.3.2.2 – Imunolocalização por microscopia confocal	35
Conclusão	40
Perspetivas Futuras.....	43
Referências Bibliográficas	44

LISTA DE FIGURAS E DE TABELAS

Figura 1 – Imagem ilustrativa de um hipocampo de um doente MTLE.

Figura 2 – Sinalização adenosinérgica.

Figura 3 – Validação dos sinaptossomas como modelo experimental.

Figura 4 - Bloqueio de ligações inespecíficas.

Figura 5 - Método de marcação indireta

Figura 6 - Imagens ilustrativas da formação hipocampal.

Figura 7 - Imagens representativas de esclerose hipocampal (região hilo/CA4) num doente com MTLE comparativamente com o hipocampo de um indivíduo controlo.

Figura 8 – Avaliação dos níveis de expressão proteica do recetor A_1 em hipocampo controlo e MTLE por WB.

Figura 9 - Comparação da imunoreatividade do recetor A_1 no giro dentado (GD) e no Hilo/CA4 do hipocampo de um indivíduo controlo e de um doente com MTLE.

Figura 10 - Avaliação da localização celular do recetor A_1 na região hilar/CA4 do hipocampo humano

Figura 11 - Pormenor da co-localização do recetor A_1 com o marcador de terminais nervosos SiF numa secção do hipocampo de um doente com MTLE.

Figura 12 – Avaliação dos níveis de expressão proteica do recetor A_{2A} em hipocampo de indivíduos controlo e doentes com MTLE por WB.

Figura 13 - Comparação da imunoreatividade do recetor A_{2A} nas regiões giro dentado (GD), corno de Amon (CA1 e CA3) e Hilo/CA4 do hipocampo de um indivíduo controlo e de um doente com MTLE.

Figura 14 - Avaliação da localização celular do recetor A_{2A} na região hilar/CA4 do hipocampo humano.

Figura 15 - Pormenor da co-localização do recetor A_{2A} com o marcador de células gliais, GFAP, numa secção do hipocampo de um doente com MTLE.

Tabela 1 – Anticorpos primários e secundários usados para a deteção proteica por *Western Blotting*

Tabela 2 – Anticorpos primários e secundários usados em imunofluorescência.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	Desaminase da adenosina
AMP	5'-monofato de adenosina
ADP	5'-difosfato de adenosina
AK	Adenosina Cinase
ATP	5'-trifosfato de adenosina
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albumina sérica bovina
CA	Corno de Ammon
CHP	Centro Hospitalar do Porto
CTR	Controlo
ECL	Quimioluminescência melhorada
EEG	Electroencefalograma
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindole
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GD	Giro Dentado
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GLAST	Transportador de glutamato
HRP	Peroxidase de rábano
IL-6	Interleucina-6
LT	Lisados totais
LTP	Potenciação de longa duração
NMDA	N-metil-D-aspartato
MTLE	Epilepsia do Lobo Mesial Temporal
NF	Neurofilamento
PBS-TW	Tampão fosfato salino com <i>Tween</i>
PVDF	Fluoreto de polivinilideno

SDS-PAGE – Electroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

SiF – Sinaptofisina

SiT – Sinaptotagmina

SNC – Sistema Nervoso Central

SNPT – Sinaptossomas

SPECT – Tomografia Computorizada de Emissão de Fotões

Sub – Subículo

Tris-HCl – Tampão tris-hidroximetil aminometano/HCl

WB – *Western Blotting*

WHO – Organização Mundial de Saúde

(GLT) -1 – Transportador de glutamato

I – INTRODUÇÃO

1.1 – A epilepsia

A epilepsia é uma das doenças neurológicas mais comuns, afetando cerca de 50 milhões de pessoas em todo o mundo, 80% das quais são oriundas de países em desenvolvimento. Esta patologia é usualmente definida como uma tendência para crises convulsivas recorrentes, sendo que a palavra “epilepsia” deriva de termos latinos e gregos para “ataque” ou “ser atacado”. Trata-se de uma disfunção neurológica que pode ocorrer em qualquer espécie de mamíferos, mas é provavelmente mais frequente à medida que o cérebro atinge maior complexidade (WHO, 2005).

Esta patologia é uma síndrome heterogénea caracterizada pela ocorrência de descargas elétricas em neurónios do cérebro de indivíduos predispostos, em parte, devido a fatores genéticos subjacentes a desordens neurológicas e mecanismos neuroquímicos profundamente desconhecidos, que modificam a função neuronal e causam alterações patológicas no cérebro. As características das crises convulsivas variam em função da região do cérebro onde as alterações são despoletadas e da velocidade com que as descargas elétricas se propagam. A sua magnitude pode variar entre breves lapsos de consciência ou espasmos musculares e convulsões severas e prolongadas caracterizadas por contrações involuntárias repetidas e violentas, cuja frequência pode variar entre uma média de uma convulsão por ano e várias convulsões por dia (WHO, 2005).

Etiologicamente, a epilepsia pode ser classificada como idiopática ou sintomática. A forma idiopática é a mais comum, podendo ser geneticamente determinada, está associada a características clínicas particulares e padrões eletroencefalográficos pouco específicos. As epilepsias sintomáticas têm causas conhecidas e as mais comuns incluem traumatismo craniano, traumatismo perinatal, patologias cerebrovasculares, hipoxia cerebral, infeções cerebrais, malformações corticais e tumores cerebrais. É de salientar que a maioria das epilepsias que surgem na idade adulta é de etiologia sintomatológica (WHO, 2005).

Estudos recentes revelam que cerca de 70% dos novos casos de epilepsia diagnosticados em adultos e crianças podem ser tratados eficazmente, sendo portanto possível controlar as crises, através da administração de fármacos antiepiléticos. Após dois a cinco anos de tratamento com bons resultados, a medicação pode ser retirada a cerca de 70% das crianças e 60% dos adultos, sem o risco de ocorrência de novas crises (WHO, 2005).

1.2 – A epilepsia do lobo mesial temporal (MTLE)

A epilepsia do lobo mesial temporal, para além de ser responsável por 40% dos casos de epilepsia na idade adulta, é um dos tipos de epilepsia onde a farmacorresistência é mais comum, sendo a lobectomia anteromedial temporal com remoção do hipocampo usada para controlar as crises convulsivas em alguns doentes (Spencer *et al*, 1984). A sua etiologia foi classificada em familiar, sintomática, ou provavelmente sintomática (Engel, 2001). Estudos neuropatológicos do tecido epileptogénico ressecado revelam esclerose mesial temporal, um termo coletivo para várias patologias distintas que afetam as estruturas límbicas do cérebro (Gloor, 1991). De facto, a esclerose mesial temporal é a causa mais comum da epilepsia do lobo mesial temporal. Do ponto de vista anatomopatológico a esclerose hipocampal é caracterizada por perda neuronal e gliose, especialmente das células do setor de Sommer (CA1), mas também na região CA3, na zona dos neurónios polimórficos da região hilar e na zona dos neurónios piramidais da região CA4, com relativa preservação de CA2, subículo e giro dentado (Babb, 1987; Margerison & Corsellis, 1966). Em muitos casos o dano hipocampal na MTLE é acompanhado pela reorganização das fibras musgosas das células granulares do giro dentado, que geralmente inervam as células musgosas da região hilar e as células piramidais de CA3, bem como dos interneurónios que se projetam para o terço interno da camada molecular do giro dentado (Babb *et al*, 1991; Sutula *et al*, 1989; Szabadics & Soltesz, 2009). Na MTLE associada à esclerose hipocampal pode também encontrar-se comprometimento de outras estruturas mesiais do lobo temporal, do córtex entorrinal, bem como anomalias da substância branca e do neocórtex do lobo temporal (Kasper *et al*, 1999)(Figura 1).

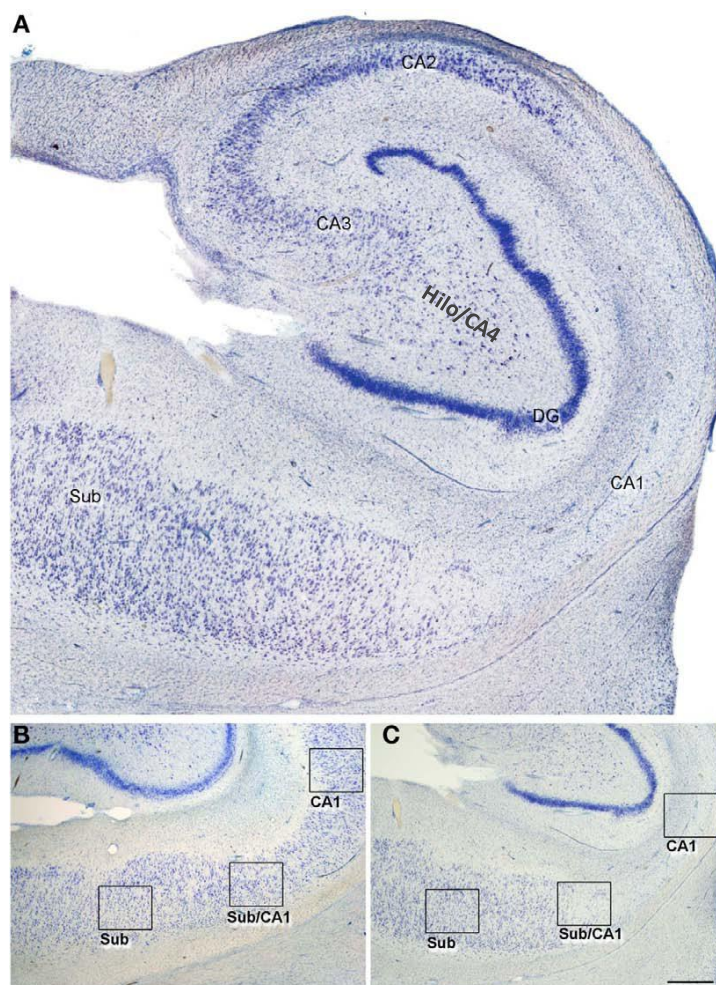


Figura 1 – Imagem ilustrativa do hipocampo de um doente com MTLE. **(A)** Fotomicrografia com reduzida ampliação de uma secção corada pela técnica de Nissl ilustrativa de um hipocampo esclerótico. **(B)** Fotomicrografia de uma secção corada pela técnica de Nissl de um hipocampo não esclerótico e **(C)** de um hipocampo esclerótico, ilustrando as diferentes regiões (CA1-3: Corno de Ammon; DG, Giro Dentado; Sub, subículo; Sub/CA1: transição entre as regiões subículo/CA1.) (adaptado de Alonso-Nanclares 2011).

O mecanismo exato através do qual uma crise epiléptica conduz à morte celular não está completamente esclarecido. Acredita-se que a libertação de substâncias excitotóxicas em grande quantidade na fenda sináptica, como o glutamato, ocasiona hiperexcitabilidade neuronal com consequente morte celular por apoptose. Baseado nesta teoria é possível explicar a suscetibilidade variável de determinadas regiões cerebrais à lesão, como o hipocampo e o neocórtex temporal, os quais possuem maior quantidade de terminações nervosas excitatórias (Auer & Siesjo, 1988; Henshall & Simon, 2005; Olney *et al*, 1983).

Os mecanismos fisiopatológicos que estão na base da epileptogénese incluem desequilíbrios entre a transmissão excitatória mediada pelo glutamato e a transmissão inibitória mediada pelo ácido gama-aminobutírico (GABA); alterações na função e composição de recetores ionotrópicos; alterações da atividade de segundos mensageiros

mediados pelo cálcio; a disfunção dos anticonvulsivantes endógenos ou dos sistemas reguladores de neuroproteção (Boison, 2007). A combinação destas disfunções da rede neuronal vai despoletar o aumento excessivo da frequência de descargas dos neurónios, que causam as crises epilépticas e o subsequente dano cerebral (Holmes & Ben-Ari, 2003). Para além da disfunção da rede neuronal, têm surgido cada vez mais evidências que apontam para o envolvimento dos astrócitos no processo epileptogénico, o que acrescenta um novo nível de complexidade aos processos subjacentes a esta patologia (Borges *et al*, 2006; Tian *et al*, 2005). Os estudos realizados indicam que os astrócitos podem contribuir tanto para a excitabilidade do foco hipocampal como para os níveis excitotóxicos de glutamato produzidos nesse foco através da sua reorganização molecular. Os astrócitos têm ainda um papel importante nas respostas imunes e inflamatórias do sistema nervoso central (de Lanerolle & Lee, 2005).

1.3 – A adenosina

A adenosina é um mensageiro purinérgico que regula muitos processos fisiológicos, particularmente em tecidos excitáveis como o coração e o cérebro (Dunwiddie & Masino, 2001). É um nucleósido ubiquitário que atua como um metabolito envolvido em vias chave do metabolismo primário, nomeadamente no metabolismo de nucleótidos e nucleósidos, no metabolismo de aminoácidos que possuem grupos sulfureto e nas reações de transmetilação e processamento de amónia. Embora a adenosina desempenhe um papel homeostático na maior parte das células, no cérebro este nucleósido desempenha outras funções para além desta, nomeadamente funções de neuromodulação e neuroproteção (Cunha, 2005). Segundo este autor existem diversas linhas de investigação que sugerem que o papel neuromodulador da adenosina é independente das alterações na carga energética das células cerebrais, o que significa que as funções neuromoduladoras do nucleósido são independentes das suas funções homeostáticas (Cunha, 2001a).

No cérebro, a adenosina comporta-se como um neuromodulador típico, ou seja, a sua sinalização controla o fluxo de informação entre neurónios, ao contrário do que acontece com os neurotransmissores em que eles próprios são veículos de informação. De fato, em contraste com os neurotransmissores, não existem evidências de acumulação de adenosina nas vesículas sinápticas ou da sua libertação de forma quântica. No entanto, a acumulação de adenosina no meio extracelular nas sinapses está relacionada com a libertação de neurotransmissores e com a frequência e intensidade de disparo neuronal (Cunha, 2005).

Efetivamente foram identificados nos terminais nervosos do hipocampo dois mecanismos principais de geração de adenosina: um resulta da sua formação através da adenosina trifosfato (ATP) libertada após a sua metabolização extracelular pelas ectonucleotidases (Cunha, 2001b); o segundo mecanismo baseia-se na libertação de adenosina através de transportadores de nucleósidos não concentrativos bidirecionais (ou equilibrativos) (Geiger & Fyda, 1991). Quando as células usam energia, o ATP é hidrolisado em adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP) e finalmente em adenosina (Dunwiddie & Masino, 2001). Grandes quantidades de adenosina são produzidas e libertadas durante situações de uso aumentado de energia, como a elevada atividade neuronal durante convulsões, ou sob condições de deficiente fornecimento energético, como isquémia ou hipoglicémia (Rudolphi *et al*, 1992). Durante situações de stresse metabólico, o consumo intracelular de ATP provavelmente excede a sua capacidade de refosforilação, conduzindo a um aumento de adenosina intracelular (Masino & Dulla, 2005). Quando os níveis intracelulares de adenosina ultrapassam a sua concentração extracelular, o transporte através de transportadores equilibrativos de nucleósidos é revertido, resultando no aumento de adenosina no meio extracelular (Geiger & Fyda, 1991). Outra fonte de adenosina extracelular é também o ATP co-libertado com diversos neurotransmissores, que aquando do aumento da atividade neuronal é libertado para a fenda sináptica atingindo níveis elevados (Cunha *et al*, 1996b). Aí o ATP é rapidamente desfosforilado em adenosina por uma família de enzimas designadas ectoNTPDases; a adenosina gerada desta forma, provavelmente contribui para a diminuição tónica da transmissão sináptica durante a atividade nervosa excessiva (Cunha *et al*, 1998; Dunwiddie *et al*, 1997). A libertação de ATP armazenado nas vesículas sinápticas é tanto maior quanto mais elevada for a frequência de estimulação dos nervos (Cunha *et al*, 1996b; Wieraszko *et al*, 1989) e a contribuição da adenosina resultante do ATP aumenta com frequências crescentes de estimulação nervosa. Por outro lado, a contribuição da adenosina libertada através dos transportadores equilibrativos de nucleósidos predomina para frequências de estimulação nervosa mais baixas (Correia-de-Sá & Ribeiro, 1996; Cunha *et al*, 1996b).

A adenosina extracelular pode ser inativada por recaptação celular através de transportadores equilibrativos de nucleósidos (Geiger & Fyda, 1991) ou por desaminação em inosina pela desaminase da adenosina (ADA) (Correia-de-Sá & Ribeiro, 1996). Através da integração destes mecanismos os níveis de adenosina endógena sofrem uma regulação fisiológica constante, influenciando a libertação de neurotransmissores e consequentemente a excitabilidade neuronal. A desregulação patológica deste sistema surge, por exemplo, quando ocorre libertação excessiva de adenosina durante as crises convulsivas (Masino & Dulla, 2005).

Também a adenosina cinase (AK) das células astrocíticas mostrou regular os níveis sinápticos basais da adenosina (Etherington *et al*, 2009). Durante crises convulsivas, a expressão de adenosina cinase é rapidamente diminuída, como uma resposta fisiológica no sentido de aumentar o tónus protetivo da adenosina (Pignataro *et al*, 2008).

A adenosina desempenha ainda outras funções no sistema nervoso central, por exemplo, é conhecida por induzir o sono (Porkka-Heiskanen *et al*, 2002); existem evidências de que poderá desempenhar um papel nos efeitos do abuso de drogas, uma vez que opiáceos, benzodiazepinas, bem como o etanol inibem a recaptção de adenosina (Dunwiddie & Masino, 2001); tem efeitos analgésicos (Dunwiddie & Worth, 1982); entre outras.

1.3.1 – Recetores da adenosina no cérebro

A adenosina exerce as suas funções através da sua ligação a quatro subtipos de recetores designados: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃. São recetores metabotrópicos acoplados a proteínas G com sete domínios transmembranares (Fredholm *et al*, 2001; Fredholm *et al*, 2005b; Fredholm *et al*, 2007). De acordo com a revisão feita por Cunha (2005) estes são recetores pleiotróficos, capazes de se acoplarem a diferentes proteínas G e a diferentes sistemas de transdução de sinal de acordo com o seu grau de ativação e com a sua localização celular e subcelular (Figura 2).

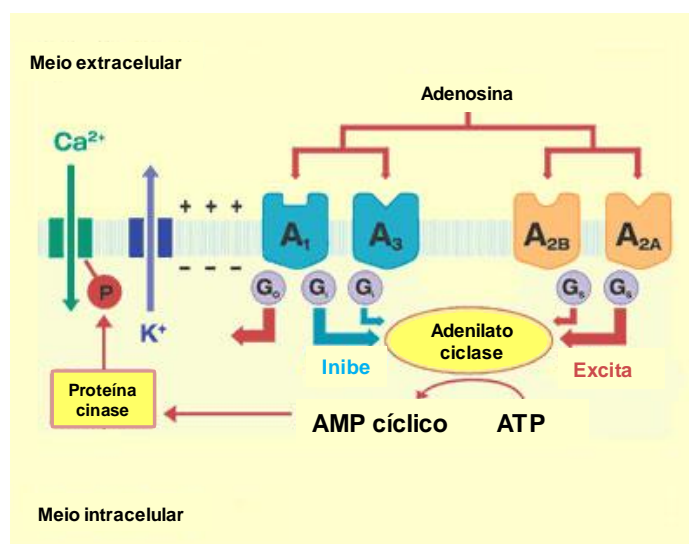


Figura 2 – Sinalização adenosinérgica. Esquema representativo dos diferentes recetores P1 da adenosina, bem como das diferentes proteínas G às quais estão acoplados e os diferentes sistemas de transdução de sinal (adaptado de <http://www.herbalzym.com/2012/01/caffeine-competitively-inhibits-different-adenosine-receptors/>).

Embora os recetores da adenosina se distribuam um pouco por todo o tecido cerebral, a sua expressão varia de acordo com a região do cérebro (Deckert *et al*, 1988; Ribeiro *et al*, 2002). O padrão de expressão específico de cada subtipo de recetor está relacionado com as funções específicas de cada um (Nyce, 1999). A elevada densidade dos recetores A_1 e A_{2A} no cérebro em conjunto com o modesto impacto que decorre da manipulação das funções dos recetores A_{2B} e A_3 , conduziu à ideia de que o impacto da adenosina nas funções cerebrais deverá depender na sua maioria das ações dos recetores A_1 e A_{2A} de elevada afinidade para o nucleósido (Fredholm *et al*, 2005a).

Os recetores de adenosina A_1 encontram-se um pouco por todo o cérebro, mas mostram maior expressão em áreas vulneráveis como o hipocampo (Dunwiddie, 1985; Dunwiddie & Masino, 2001). Estes recetores localizam-se predominantemente nos neurónios, embora também estejam presentes nas células da glia, onde modulam funções relacionadas com os astrócitos e a microglia no tecido cerebral (Biber *et al*, 1997; Gebicke-Haerter *et al*, 1996; Haselkorn *et al*, 2010; Tsutsui *et al*, 2004; van Calker & Biber, 2005). Estudos funcionais sugerem que a eficiência da ativação dos recetores A_1 e, provavelmente, a sua densidade variam de acordo com os diferentes tipos de terminais nervosos. Os recetores A_1 controlam eficientemente a libertação de glutamato, acetilcolina e serotonina, mas são incapazes de modular a libertação de GABA e de noradrenalina no cérebro (Cunha, 2001a). O efeito mais evidente da adenosina nos circuitos neuronais é a depressão da transmissão excitatória (Dunwiddie & Haas, 1985). Isto ocorre através da ativação do recetor A_1 , que se localiza pré e pós-sinapticamente ou mesmo sem ser a nível sináptico (Fredholm *et al*, 2005b). Esta inibição da transmissão sináptica excitatória, mas não da inibitória (Lambert & Teyler, 1991; Thompson *et al*, 1992; Yoon & Rothman, 1991), é sobretudo devido ao recetor A_1 pré-sináptico (Lupica *et al*, 1992; Prince & Stevens, 1992; Scanziani *et al*, 1992; Scholz & Miller, 1992; Thompson *et al*, 1992), de acordo com o enriquecimento deste recetor nas sinapses, sobretudo as excitatórias (Rebola *et al*, 2003; Rebola *et al*, 2005b; Tetzlaff *et al*, 1987). O mecanismo da inibição da transmissão sináptica mediada pelo recetor A_1 está relacionado com a inibição dos canais de cálcio do tipo N (Wu & Saggau, 1994; Yawo & Chuhma, 1993) levando à diminuição da libertação de glutamato para a fenda sináptica (Ambrosio *et al*, 1997; Dunwiddie & Haas, 1985). Pós-sinapticamente, a adenosina influencia e reatividade para estímulos excitatórios através de um controlo simultâneo de canais de cálcio do tipo N e de recetores N-metil-D-aspartato (NMDA) (de Mendonça *et al*, 1995; Klishin *et al*, 1995). A nível não-sináptico os recetores A_1 controlam as correntes de potássio conduzindo à hiperpolarização das células (Greene & Haas, 1991).

Em geral, os recetores da adenosina do subtipo A_{2A} estão envolvidos na facilitação do disparo neuronal. Embora se encontrem em todas as regiões cerebrais, estes

recetores são particularmente expressos no núcleo accumbens, no tubérculo olfativo e no estriado, onde estão colocalizados com os recetores D_2 da dopamina (Kull *et al*, 1999; Moreau & Huber, 1999; Ongini & Fredholm, 1996). Os recetores A_{2A} extra-estriatais, para além de controlarem a libertação de glutamato (Lopes *et al*, 2002) e acetilcolina (Cunha *et al*, 1994; Jin & Fredholm, 1997; Okada *et al*, 2001; Rebola *et al*, 2002) podem ainda controlar a libertação de GABA (Cunha & Ribeiro, 2000) e de noradrenalina (Barraco *et al*, 1995). Embora a sua localização nestas regiões seja predominante neuronal, os recetores A_{2A} estão também presentes em astrócitos (Li *et al*, 2001; Nishizaki *et al*, 2002), na microglia (Fiebich *et al*, 1996; Kust *et al*, 1999) e nas células endoteliais dos vasos sanguíneos cerebrais (Coney & Marshall, 1998; Ngai *et al*, 2001). Estes recetores localizam-se sobretudo nas sinapses (Rebola *et al*, 2005a). Apesar de possuírem um impacto limitado no controlo da transmissão sináptica “basal”, desempenham um papel crucial no controlo da plasticidade neuronal (Cunha, 2008). Assim, pré-sinápticamente os recetores A_{2A} conseguem controlar a libertação de glutamato e a sua principal função é atenuar a profunda inibição da transmissão sináptica mediada pelos recetores A_1 (Ciruela *et al*, 2006; Lopes *et al*, 1999), o que possibilita um aumento da eficiência das sinapses. A nível pós-sináptico estes recetores podem controlar os recetores NMDA (Higley & Sabatini, 2010; Rebola *et al*, 2008; Wirkner *et al*, 2004), o que proporciona um mecanismo base para o entendimento das observações de que o bloqueio farmacológico ou genético dos recetores A_{2A} pode atenuar a potenciação de longa duração (LTP) de diferentes sinapses excitatórias (d'Alcantara *et al*, 2001; Rebola *et al*, 2008). Curiosamente, inibidores dos recetores A_{2A} desempenham uma forte ação neuroprotetora e previnem a apoptose (Silva *et al*, 2007).

Os recetores de adenosina A_{2B} encontram-se na maioria dos tecidos, mas geralmente apresentam baixos níveis de expressão, inclusive no cérebro (Dixon *et al*, 1996) parecendo existir essencialmente em astrócitos (Allaman *et al*, 2003). Pouco se sabe acerca do papel fisiológico destes recetores, contudo foi sugerido que desempenham um papel na vascularização e no controlo do fluxo sanguíneo cerebral (Grant *et al*, 2001; Ralevic & Burnstock, 1998; Shin *et al*, 2000). A estimulação destes recetores mostrou induzir a libertação de fatores de crescimento do endotélio vascular em células endoteliais cerebrais e periféricas (Feoktistov *et al*, 2002; Fischer *et al*, 1995; Grant *et al*, 2001; Grant *et al*, 1999). Há indicações de que os recetores A_{2B} estão envolvidos em ações neuroexcitatórias e que a sua estimulação agrava o dano tecidular (Feoktistov & Biaggioni, 1997). Nas células da glia estes recetores mostraram induzir a libertação de IL-6 (Fiebich *et al*, 1996; Schwaninger *et al*, 1997).

Os recetores A_3 estão amplamente distribuídos pelo cérebro, porém o seu papel fisiológico ainda não se encontra claramente esclarecido. A presença destes recetores

em neurónios já foi confirmada através de estudos de ligação específica (Diaz-Hernandez *et al*, 2002), de imunohistoquímica (Lopes *et al*, 2003) e através de estudos funcionais (Brand *et al*, 2001; Costenla *et al*, 2001), porém, a sua função é mais evidente em astrócitos (Abbracchio *et al*, 1997) e na microglia (Hammarberg *et al*, 2003). Estes recetores modulam, em conjunto com os recetores A_1 , a inibição da transmissão sináptica (Brand *et al*, 2001) e desempenham um papel na modulação da plasticidade sináptica (Costenla *et al*, 2001). Von Lubitz e colegas mostraram que a estimulação dos recetores A_3 induz a apoptose do tecido cerebral. A indução da apoptose de neurónios danificados no decorrer de um acidente vascular cerebral é benéfica na medida em que limita a neuroinflamação (von Lubitz *et al*, 1999). Contrariamente, a estimulação deste recetor com baixas concentrações de adenosina parece induzir efeitos neuroprotetores (Abbracchio *et al*, 1997; Fedorova *et al*, 2003). Este paradoxo tem significância fisiológica, uma vez que elevados níveis de adenosina na área afetada pelo dano isquémico induz apoptose através da ação do recetor A_3 , enquanto no tecido cerebral periférico baixos níveis de adenosina exercem o seu efeito neuroprotetor mediado pelo mesmo recetor. Mais ainda, vários estudos indicam que a estimulação do recetor A_3 nas células da glia conduz à neuroprotecção pela indução do rearranjo do citoesqueleto (Abbracchio *et al*, 2001).

Os quatro subtipos de recetores da adenosina têm diferentes afinidades para esta molécula. Enquanto os recetores A_1 e A_{2A} têm relativa alta afinidade (na gama dos nanomolar) para a adenosina em roedores, os recetores A_{2B} e A_3 têm uma afinidade muito mais baixa e apenas são ativados a concentrações na gama dos micromolar (Dunwiddie & Masino, 2001). Estas diferenças na afinidade de cada subtipo de recetor refletem uma significância funcional. Assim, a coexistência de diferentes recetores pode determinar diferentes respostas funcionais dependendo das concentrações extracelulares de adenosina. Estas observações mostram que o sistema adenosinérgico regula de maneira muito fina uma complexa panóplia de atividades biológicas.

1.3.2 - O papel neuromodulador da adenosina

A adenosina é um neuromodulador que opera, sobretudo, como já foi referido através dos recetores inibitórios do subtipo A_1 , que são os mais abundantes. A adenosina pode, ainda, exercer a sua atividade através de recetores menos abundantes, mas amplamente dispersos, como é o caso dos recetores facilitatórios A_{2A} . É um fato que o cérebro é o tecido que possui maior densidade de recetores A_1 . É portanto expectável que o efeito predominante da adenosina no cérebro seja a inibição da libertação de

neurotransmissores. De acordo com estas predições, estudos eletrofisiológicos que se debruçaram sobre o papel da adenosina em fatias de cérebro concluíram que a adenosina tem como principal função inibir a excitabilidade neuronal e a transmissão sináptica (Greene & Haas, 1991; Phillis & Wu, 1981). Este efeito inibitório da adenosina é mediado pelos recetores A_1 e em concordância está o fato da adenosina se encontrar praticamente desprovida de efeitos em fatias de cérebro de ratos transgénicos (*knockout*) para recetores A_1 (Johansson *et al*, 2001).

Também o recetor A_{2A} parece ter um papel ativo no controlo da libertação de neurotransmissores, embora, contrariamente ao recetor A_1 , a sua função assente na facilitação da libertação da maioria dos neurotransmissores.

Em suma, a adenosina, através da sua capacidade de ativar recetores com funções opostas (A_1 *versus* A_2) torna-se num regulador chave para o controlo das funções excitatórias e inibitórias do SNC (Boison, 2008). Enquanto os recetores A_1 definem um ambiente globalmente inibitório no cérebro e promovem a depressão heterossináptica, os recetores facilitatórios A_{2A} são capazes de potenciar a transmissão sináptica selecionada dentro de uma rede globalmente inibida (Cunha, 2008).

1.4 – A epilepsia e a adenosina

A epilepsia corresponde a uma série de distúrbios no disparo neuronal, frequentemente acompanhado pela elevação da atividade encefalográfica (Engel & Pedley, 2007). As crises epiléticas são tradicionalmente vistas como um desequilíbrio entre a transmissão excitatória e inibitória nos circuitos cerebrais, no qual a hiperexcitação ou a hipo-inibição pode resultar num disparo repetitivo anormal dos circuitos cerebrais (Meldrum & Rogawski, 2007). O potencial da adenosina como uma substância antiepilética (Tomé *et al*, 2010) emergiu com base em duas observações paralelas: primeiro, o recetor A_1 está enriquecido nas sinapses excitatórias, onde inibe a libertação de glutamato diminuindo a resposta glutamatérgica, e hiperpolariza os neurónios, ações estas indispensáveis à diminuição da hiperexcitabilidade associada à epilepsia; segundo, os níveis de adenosina endógena extracelular aumentam consideravelmente durante as crises convulsivas, podendo atingir concentrações de ordem micromolar capazes de levar à cessação das convulsões (Berman *et al*, 2000; Dunwiddie & Worth, 1982; During & Spencer, 1992; Ribeiro *et al*, 2002), o que pode ser interpretado como um indicador de que a adenosina poderá desempenhar um papel como antiepilético endógeno. Uma variedade de estudos confirmou que a administração aguda tanto de agentes que potenciem o aumento dos níveis de adenosina extracelular (inibidores dos transportadores de adenosina ou do metabolismo da adenosina) como de agonistas dos

recetores A_1 , atenua as crises epiléticas ou a atividade convulsiva em diferentes modelos animais. Paralelamente, a administração aguda de antagonistas não-seletivos dos recetores da adenosina (como a cafeína ou a teofilina) ou de antagonistas seletivos dos recetores A_1 aumenta a duração e a severidade das crises e/ou convulsões (Boison, 2008; Dragunow, 1988; Dunwiddie, 1999; Malva *et al*, 2003; Tomé *et al*, 2010). Porém, vários estudos mostraram uma diminuição da densidade e/ou eficácia dos recetores A_1 na região sináptica em modelos animais de epilepsia (Ekonomou *et al*, 2000; Glass *et al*, 1996; Ochiishi *et al*, 1999; Rebola *et al*, 2003; Rebola *et al*, 2005b). Assim, o sistema inibitório operado pelo recetor A_1 parece funcionar como um obstáculo ativo de maneira a evitar o início de uma crise epilética; uma vez ultrapassado esse obstáculo, ocorre uma dessensibilização do sistema criando condições para a progressão do fenómeno epileptogénico.

Um número crescente de estudos, sobre a modulação da epilepsia pela adenosina, concentrou as suas atenções no possível papel facilitatório do recetor A_{2A} no controlo da epilepsia (Tomé *et al*, 2010). Curiosamente, na epilepsia crónica parece existir um marcado aumento (cerca de 200%) do recetor A_{2A} (Rebola *et al*, 2005a). Ainda que o impacto do recetor A_{2A} no início de uma crise epilética permaneça duvidoso (Malva *et al*, 2003; Tomé *et al*, 2010), estudos recentes mostraram que o bloqueio deste recetor, através de deleção genética ou de antagonista seletivos (El Yacoubi *et al*, 2009) ou não-seletivos, como a administração crónica de cafeína (El Yacoubi *et al*, 2008), pode fornecer proteção contra a evolução da severidade das crises. Assim, o recetor A_{2A} parece controlar a evolução e as consequências das crises, embora o mecanismo envolvido (glial ou neuronal) permaneça por esclarecer (Chen *et al*, 2007; Cunha, 2005; Tomé *et al*, 2010). Curiosamente, a fonte de adenosina proposta como preferencial para ativar os recetores A_{2A} (adenosina derivada de ATP formado através da via das ecto-nucleotidases (Cunha *et al*, 2008; Cunha, 2001a; Cunha, 2001b; Cunha *et al*, 1996a)), está alterada em roedores “epiléticos”. Desta forma, o comprometimento da libertação neuronal de ATP associa-se a défices na sua metabolização extracelular por parte das ecto-NTPDases (Bonan *et al*, 2000; Nagy *et al*, 1990; Nagy *et al*, 1997; Rebola *et al*, 2003). O aumento da densidade e atividade da ecto-5'-nucleotidase (Bonan *et al*, 2000; Rebola *et al*, 2003), que é frequentemente o passo limitante da formação de adenosina a partir do ATP extracelular (Cunha, 2001b; James & Richardson, 1993) e a sobreexpressão do recetor A_{2A} , não conseguem compensar a falta do ligando endógeno. Neste contexto, dificilmente se compreende que o uso de antagonistas dos recetores A_{2A} possam trazer efeitos benéficos em modelos animais de epilepsia, a menos que se pressuponha que o bloqueio desses recetores previna a sua sobreexpressão e/ou os efeitos tróficos que lhe podem estar associados. Concluindo, a ativação de recetores A_{2A} gera ainda alguma

controvérsia, uma vez que estes recetores tanto podem ter características anticonvulsivantes como pró-convulsivantes (Boison, 2005; Boison, 2007).

Resta salientar que todos estes estudos realizados em modelos animais de epilepsia têm como limitação o fato de não ser possível reproduzir a cronicidade do processo epileptogénico nestes modelos, bem como as características neuropatológicas que dela advêm, pelo que todas as conclusões que derivam destes estudos necessitam de confirmação em tecido humano epilético.

1.5 – Papel dos astrócitos na epilepsia

Pesquisas recentes sugerem a existência de uma base astrocítica para a epilepsia. Os astrócitos estão intimamente relacionados com os neurónios, tanto em termos anatómicos como funcionais, e são atualmente considerados reguladores-chave da função neuronal através de um mecanismo chamado “gliotransmissão” (Haydon & Carmignoto, 2006). Tornou-se claro que os astrócitos e os fatores deles derivados desempenham um papel crítico na modulação da atividade convulsiva aguda e crónica.

Embora o glutamato derivado das células neuronais continue a ter o papel principal na atividade convulsiva, tem sido dada cada vez mais atenção aos astrócitos como fonte de glutamato extracelular, quer no cérebro normal quer no epilético. Através da libertação de ATP e de glutamato, frequentemente por intermédio da libertação sináptica regulada, um único astrócito tem a capacidade única de regular a atividade de centenas de dendrites neuronais (Halassa *et al*, 2007; Oberheim *et al*, 2008). A perda deste domínio astrocítico parece ter um papel fundamental na patogénese da epilepsia (Oberheim *et al*, 2008). De fato, a astrogliose é uma das características fisiopatológicas do cérebro epilético e um constituinte ubíquitário da cascata epileptogénica. Vários estudos sugerem que a disfunção dos astrócitos contribui para a epileptogénese e para a ocorrência de convulsões na epilepsia. Já foi demonstrado que a incapacidade da glia tamponar o glutamato extracelular ou a existência de uma disfunção na libertação de glutamato por estas células, pode contribuir para manutenção da mudança do padrão de despolarização que caracteriza a disfunção neuronal na epilepsia (Tian *et al*, 2005). Assim, as concentrações fisiológicas de glutamato no meio extracelular são controladas sobretudo por dois transportadores de glutamato astrocíticos, o (GLT)-1 e o GLAST. Estes transportadores previnem a acumulação de glutamato para concentrações excitotóxicas, tal como foi demonstrado em animais com uma deleção genética das duas proteínas (Rothstein *et al*, 1996; Tanaka *et al*, 1997; Watanabe *et al*, 1999). Estes transportadores seletivos não são os únicos determinantes da concentração extracelular de glutamato relacionados com a função astrocítica, Haydon e colegas (2006) mostraram que a

estimulação neuronal induz uma resposta de cálcio dependente da frequência em astrócitos vizinhos, que por sua vez libertam glutamato. Este glutamato derivado de astrócitos, por sua vez, modula a transmissão neuronal glutamatérgica (Araque *et al*, 1999). Assim, qualquer quebra na sintonia desta conversação entre neurónios e astrócitos pode resultar num aumento de glutamato libertado durante a atividade epiléptica (Fellin & Haydon, 2005), indicando que os astrócitos estão envolvidos na epileptogénese.

Para além do que foi referido, os astrócitos têm ainda um papel importante na regulação da disponibilidade extracelular de adenosina (Boison, 2008). A regulação dos níveis de adenosina (intra e extracelular) envolve a fosforilação da adenosina com formação de AMP pela adenosina cinase ou a sua desaminação pela adenosina desaminase que leva à formação de inosina (Wetherington *et al*, 2008). A enzima adenosina cinase, existente nos astrócitos constitui o principal motor para a recaptação metabólica da adenosina e desta forma regula os níveis extracelulares deste nucleósido (Wetherington *et al*, 2008). Um ciclo de substrato muito ativo entre a adenosina e o AMP envolvendo a adenosina cinase e a 5'-nucleotidase permite que pequenas alterações na atividade da adenosina cinase se traduzam rapidamente em grandes alterações na adenosina ambiente (Arch & Newsholme, 1978). Níveis elevados de adenosina cinase estão associados a convulsões e ao aumento da suscetibilidade a lesões cerebrais, enquanto níveis diminuídos desta enzima promovem a supressão das convulsões e neuroprotecção. A expressão de adenosina cinase pode ter uma regulação bifásica durante a epileptogénese. Assim, após uma fase aguda de excitação observa-se uma redução da expressão de adenosina cinase com consequente elevação dos níveis de adenosina como mecanismo de neuroprotecção; na epilepsia crónica, por outro lado, observa-se uma sobre-expressão da referida enzima. Uma vez que no cérebro adulto a adenosina cinase é primariamente uma enzima astrocitária, a astrogliose contribui para a sobreexpressão da adenosina cinase na epilepsia crónica. Recentemente, demonstrou-se uma correlação entre a astrogliose, a sobreexpressão de adenosina cinase e o aparecimento de convulsões espontâneas num modelo de epileptogénese na área CA3 do hipocampo de rato, sugerindo que a astrogliose e/ou sobreexpressão de adenosina cinase contribuem para o fenómeno epileptogénico (Li *et al*, 2008). É também importante referir que os astrócitos para além de mediar a gliotransmissão podem ainda sintetizar citocinas pró e anti-inflamatórias durante as convulsões (Ravizza *et al*, 2008).

1.6 - Aplicações terapêuticas baseadas na sinalização pela adenosina na epilepsia

Estando a adenosina envolvida em diversas funções fisiológicas, moléculas que interagem com a sinalização pela adenosina podem ser desenvolvidas com a finalidade

de tratar uma variedade de situações patológicas. No entanto, estas moléculas podem causar efeitos secundários severos uma vez que os recetores de adenosina estão amplamente distribuídos no organismo. Isto explica porque presentemente apenas algumas destas moléculas são usadas na prática clínica, apesar da extensa investigação científica acerca do papel da adenosina desde 1929 (Drury & Szent-Gyorgyi, 1929).

A adenosina é um anti-epiletico endógeno, e como tal, tratamentos que facilitem a neuromodulação baseada na adenosina deverão ser eficazes na prevenção de crises epiléticas (Boison, 2005). O fato da maioria dos doentes com epilepsia refratária serem resistentes a vários fármacos anti-epiléticos, sugere mecanismos adaptativos não-específicos, tais como a elevada expressão de transportadores ABC na barreira hemato-encefálica, que possivelmente tenham evoluído para a excreção de toxinas que ocorrem naturalmente (Loscher & Potschka, 2002). Sendo assim, novas estratégias terapêuticas que tiram partido dos mecanismos anti-epiléticos endógenos do cérebro (tal como a adenosina) são menos propensas à atividade dos transportadores ABC.

Uma vez que, a ativação dos recetores da adenosina A_1 parece reduzir as convulsões induzidas por estímulos químicos ou elétricos (Concas *et al*, 1993; De Sarro *et al*, 1999; Monopoli *et al*, 1996; Young & Dragunow, 1994), o uso de agonistas dos recetores A_1 da adenosina poderá ser usado como terapêutica em alguns tipos de epilepsia. Num estudo recente, utilizaram CCPA (2-cloro-N6-ciclopentiladenosina), um agonista seletivo do recetor A_1 , com o objetivo de suprimir crises epiléticas farmacoresistentes induzidas pelo kainato numa ratazana, contudo a injeção intraperitoneal deste agonista não demonstrou utilidade clínica, sobretudo devido aos efeitos secundários cardiovasculares (Olsson & Pearson, 1990; Shryock & Belardinelli, 1997), bem como devido à sua fraca permeabilidade cerebral (Brodie *et al*, 1987), o que reduz a probabilidade de sucesso do agonista do recetor A_1 após o dano cerebral (von Lubitz *et al*, 1999). Para ultrapassar estes problemas, varias estratégias têm sido avaliadas em diversos estudos experimentais com modelos animais de epilepsia, tais como implantes cerebrais baseados em polímeros de libertação controlada de adenosina, células encapsuladas, implantes cerebrais derivados de células estaminais e terapia génica (Boison & Stewart, 2009). Os resultados obtidos em vários estudos, tanto em modelos de epilepsia crónica como na epilepsia aguda, sugerem que este tipo de terapias têm propriedades anticonvulsivas, possivelmente antiepileptogénicas, neuroprotetoras e/ou neuro-reparadoras (Boison & Stewart, 2009). Contudo, estes ensaios carecem de comprovação de que os efeitos / mecanismos verificados nos modelos animais são análogos aos observados na epileptogénese humana e que a sua aplicabilidade clínica seja uma realidade.

OBJETIVOS

- Implementação da técnica de imunofluorescência aplicada à microscopia confocal para recetores purinérgicos em cérebro humano no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS – UP;
- Investigar a expressão e distribuição dos receptores P1 da adenosina (A_1 e A_{2A}) em tecido de hipocampo de doentes com epilepsia fármaco-resistente do lobo mesial temporal (MTLE) comparativamente com cadáveres sujeitos a autópsias-médico legais (controlos) por imunofluorescência aplicada à microscopia confocal
- Avaliar quantitativamente a expressão dos receptores A_1 e A_{2A} da adenosina em lisados totais e terminais nervosos (sinaptossomas) isolados do hipocampo humano por *Western Blotting*

II – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Descrição metodológica da obtenção e manuseamento dos tecidos

2.1.1 - Tecido cerebral de pacientes com epilepsia MTLE

O tecido humano utilizado neste estudo foi colhido de doentes submetidos a amigdaló-hipocampectomia seletiva para tratamento cirúrgico de epilepsia do lobo temporal resistente à farmacoterapia do tipo MTLE. Embora o procedimento possa incluir apenas a remoção do hipocampo esclerosado, a abordagem da equipa médica do Serviço de Neurocirurgia do Centro Hospitalar do Porto (CHP) inclui por rotina a remoção simultânea do córtex temporal adjacente ao hipocampo esclerosado, o que não só facilita o acesso cirúrgico ao foco epileptogénico hipocampal, como também parece melhorar significativamente a recuperação do doente no que respeita à recorrência de crises convulsivas pós-cirúrgicas (Avoli *et al*, 2005). Todos os doentes se encontravam inscritos na consulta de Epilepsia do Serviço de Neurologia e foram operados no Serviço de Neurocirurgia do Centro Hospitalar do Porto, no âmbito do programa de cirurgia de epilepsia do hospital, monitorizado superiormente pelo Ministério da Saúde. A execução da cirurgia foi levada a cabo após consenso entre os elementos da Equipa Multidisciplinar de Cirurgia da Epilepsia do CHP. Os diversos casos clínicos foram avaliados por exames imagiológicos (tomografia axial computadorizada, ressonância magnética), monitorização vídeo-EEG, SPECT ictal e inter-ictal, avaliação neuropsicológica e teste de Wada, com o objetivo de determinar o foco epileptogénico de origem das crises e a indicação ou a contra-indicação cirúrgica. A colheita do material biológico foi resultante do procedimento cirúrgico e a peça operatória foi a mesma que é habitualmente removida na referida intervenção e que é utilizada para caracterização anátomo-patológica. O tecido de hipocampo e de córtex temporal adjacente destinado ao estudo foi identificado e orientado anatomicamente após remoção pelo neurocirurgião, tendo sido imediatamente colocado num recipiente de transporte contendo líquido céfalo-raquidiano artificial gelado, cuja composição é a seguinte (em mM): NaCl 124, KCl 3, NaH₂PO₄ 1,2, NaHCO₃ 26, MgCl₂ 1, CaCl₂ 2, glucose 10, saturado com 95% de O₂ e 5% de CO₂, pH 7.3-7.4. Após estes procedimentos o tecido foi imediatamente transportado para o Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS-UP, para ser devidamente processado.

2.1.2 - Tecido de cadáver humano proveniente de autópsias médico-legais

Paralelamente, realizaram-se ensaios utilizando amostras de hipocampo de cadáveres autopsiados no Instituto de Medicina Legal (Delegação do Porto), cujo

intervalo post-mortem não excedeu as 4-5 horas. Não foi aceite como objeto de estudo tecido proveniente de indivíduos cuja morte foi provocada por traumatismo ou doença neurológica, ou daqueles que tinham historial de alcoolismo ou toxicodependência. Os procedimentos de colheita e manuseamento do tecido foram análogos aos acima descritos para as amostras de tecido provenientes de cirurgia.

Este trabalho faz parte de um projeto multidisciplinar que inclui equipas do ICBAS, do Centro Hospitalar do Porto e do Instituto Nacional de Medicina Legal (Delegação do Porto). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelas respetivas comissões de ética das respetivas entidades envolvidas, bem como pelo Ministério Público por via da utilização de material proveniente de autópsias médico-legais. Todos os doentes foram informados desses procedimentos e os estudos de investigação com estes tecidos apenas foram efetuados após consentimento escrito e devidamente informado. A investigação obedece aos princípios consignados na Declaração de Helsínquia.

2.2 – Western Blotting (WB)

2.2.1 – Preparação das amostras

2.2.1.1 – Homogeneização das amostras

As amostras de hipocampo de indivíduos controlo e doentes com MTLE (duas e quatro respetivamente) foram homogeneizadas (homogeneizados totais) a 4°C numa solução de 50mM Tris-HCl pH 7.4 contendo inibidores de proteases (*Protease inhibitor cocktail*; Sigma), com recurso a um homogeneizador do tipo *Potter* (aproximadamente 15 a 20 *strokes*) e posteriormente armazenados a -20°C.

2.2.1.2 – Preparação dos sinaptossomas

Prepararam-se sinaptossomas de hipocampo de doentes com epilepsia MTLE e de cadáver humano, de acordo com o procedimento descrito por Wittaker (1965) e Helme-Guizon (1998) e posteriormente modificado por Bancila (2009).

Preparou-se meio Krebs de mamífero modificado cuja composição é a seguinte (em mM): NaCl 136; KCl 3; MgCl₂ 1,2; CaCl₂ 2,2; NaHCO₃ 16,2; glucose 5,5; Na₂HPO₄ 1,2. O meio foi oxigenado com 95% de O₂ e 5% CO₂ durante cerca de 10 minutos e o pH foi corrigido para 7.4 com NaOH ou HCl.

O tecido foi imediatamente colocado em meio Krebs a 4°C. Removeu-se a matéria branca (axónios mielinizados). Cortou-se o tecido em cubos com aproximadamente 1

mm de lado, colocou-se num tubo de ensaio em cerca de 1 mL de meio Krebs a 4°C e homogeneizou-se gentilmente com o auxílio de uma pipeta automática P1000, fazendo aspirações sucessivas até que o homogeneizado passasse livremente através da ponta. Adicionou-se meio à temperatura ambiente até perfazer 7 mL. O homogeneizado foi filtrado para um tubo de ensaio através de um filtro de nylon com 100 µm de poro e 47 mm de diâmetro, usando como suporte um funil de vidro. Deixaram-se sedimentar os sinaptossomas (1 × g) durante cerca de 30-40 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento de sinaptossomas foi rapidamente centrifugado (1 minuto a 14.000 rpm) para retirar o meio de preparação, o *pellet* ressuspenso com uma solução de 50 mM Tris-HCl pH 7.4 contendo inibidores de proteases (*Protease inhibitor cocktail*; Sigma) e posteriormente armazenados a -20°C.

2.2.1.3 – Quantificação de proteína

A quantificação proteica foi efetuada através do método do ácido bicinonínico (BCA). O método do BCA permite a deteção colorimétrica e a quantificação de proteína, sendo que a intensidade da cor é proporcional à concentração de proteína.

Os ensaios foram realizados usando o kit BCATM (kit de doseamento de proteína da Pierce), segundo os procedimentos indicados pelo fabricante. As concentrações de proteína foram calculadas com base num padrão de proteína, que neste caso foi a albumina sérica bovina (BSA). Os ensaios foram realizados com 50 µl de amostra em placas de 96 poços. O reagente de trabalho foi preparado com 50 partes de reagente A e uma parte de reagente B. Esta solução foi adicionada às amostras e padrões. Todas as amostras foram incubadas 30 minutos a 37°C e seguidamente foram lidas a 562 nm num leitor de microplacas (BioTek SynergyTM HT).

2.2.1.4 – Lise das amostras de tecido e sinaptossomas humanos

Após ter sido determinada a quantidade de proteína pelo método do ácido bicinonínico, os homogeneizados totais e os sinaptossomas foram diluídos em dois volumes de uma solução de lise (8M ureia, 8% β-mercaptoetanol, 2% SDS, 375mM Tris-HCl pH 6.8 e 0,00125% azul de bromofenol) e seguidamente incubados a 37°C durante duas horas de modo a obterem-se os lisados (totais e sinaptossomais).

2.2.2 – SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida efetuada na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) é habitualmente conhecida por SDS-PAGE (Laemmli, 1970; Weber &

Osborn, 1969). Na técnica de SDS-PAGE, as proteínas migram através dos poros do gel em resposta a um campo elétrico.

O método aplicado consistiu num sistema de tampão descontínuo, descrito pela primeira vez por Laemmli (1970), no qual o gel se encontra dividido num gel de empacotamento com pH 6.8 (*stacking gel*) e num gel de corrida com pH 8.8 (*running gel*). As experiências foram realizadas num sistema de mini-gel vertical da Bio-Rad (8 cm comprimento, 1,5 mm espessura e 7 cm de largura) de acordo com as instruções do fabricante. A separação das amostras por SDS-PAGE é determinada pelo tamanho relativo dos poros formados na malha do gel de poliacrilamida. O tamanho do poro é estabelecido tendo em conta dois fatores: a quantidade total de acrilamida presente (%T) e a quantidade do *cross-linker* (bisacrilamida) (%C). Assim sendo, nas nossas experiências, a solução de acrilamida/bis (Merck) foi usada na proporção de 29,1:0,9 e a concentração de monómero foi de 5% para o *stacking gel* e 10% para o *running gel*, dado termos considerado que esta percentagem se adaptava melhor ao peso molecular das proteínas em estudo. O marcador de peso molecular usado foi o *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Fermentas Life Sciences).

A eletroforese decorreu inicialmente a 92V até ao empacotamento das proteínas e a 135V durante o restante tempo de corrida com o uso de tampão de eletroforese (25 mM Tris base, 0,25 M Glicina, 0,1% SDS, pH 8.3).

2.2.3 – Transferência de proteínas

O método usado neste estudo para transferir as proteínas do gel para um suporte sólido (membrana) é denominado por transferência molhada (*wet transfer*) que foi efetuada com um sistema da Bio-Rad. Após a eletroforese, os géis foram colocados em cassetes de transferência juntamente com as membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF; Immobilon-P, Millipore), entre papel *Whatman* 3mm e duas esponjas.

As cassetes foram colocadas num tanque, imersas em tampão de transferência (25 mM Tris base, 192 mM Glicina, 20% Metanol, pH 8.3), sendo aplicada uma corrente constante de 175 mA/gel durante cerca de duas horas.

A eficiência da transferência foi avaliada por coloração das membranas com uma solução aquosa de *Ponceau S* (0,1% (p/v) *Ponceau S* em 5% (p/v) ácido acético).

Após a transferência proteica as membranas de PVDF foram processadas com o objetivo de detetar as proteínas de interesse.

2.2.4 – Detecção imunológica das proteínas

Após transferência proteica, as membranas de PVDF foram bloqueadas numa solução de PBS com 5% leite em pó magro e 0,1% *Tween*-20 durante duas horas à temperatura ambiente de forma a evitar ligações inespecíficas do anticorpo primário e consequente surgimento de *background*.

Os anticorpos primários e secundários foram diluídos numa solução de PBS com 3% leite em pó magro e 0,1% *Tween*-20. Os anticorpos usados nestas experiências, bem como as respetivas diluições encontram-se descritos na Tabela 1.

Após incubação dos anticorpos primários durante 12-16 horas a 4°C, seguiram-se três ciclos de lavagem com uma solução de PBS com 0,1% *Tween*-20 (PBS-TW). Seguidamente, incubaram-se os anticorpos secundários, conjugados com a peroxidase de rábano (*Horseradish peroxidase*, HRP) durante duas horas à temperatura ambiente e após três novos ciclos de lavagem com PBS-TW, as proteínas foram detetadas nas membranas através de um método de deteção quimiluminescente com o sistema ECL *Plus* (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

Tabela 1 – Anticorpos primários e secundários usados para a deteção proteica por *Western Blotting*

Anticorpo primário	Hospedeiro	Diluição	Anticorpo secundário	Diluição
Recetor A ₁ da adenosina (abcam)	Coelho (rb)	1:600	Anti-rb IgG HRP (abcam)	1:30.000
Recetor A _{2A} da adenosina (Alfa Diagnostic)		1:500		
β-Actina (abcam)		1:5000		
β-Tubulina (abcam)		1:2500		
Proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Chemicon)	Rato (ms)	1:500	Anti-ms IgG HRP (abcam)	1:10.000
Sinaptofisina (SiF) (Chemicon)		1:750		

2.2.5 – Análise densitométrica

As imagens dos géis foram obtidas com o sistema de aquisição de imagens Chemidoc MP Imaging System e analisadas com o *software* associado, o Image Lab V4.0 (Bio-Rad Laboratories). Sempre que possível as amostras foram normalizadas tendo em conta um controlo de carregamento (*loading control*) – β -actina ou β -tubulina.

2.2.6 – Validação dos sinaptossomas como modelo experimental

Os sinaptossomas são terminais nervosos arrancados e resselados, livres da sua integração numa rede neuronal ou mesmo numa sinapse, embora por vezes contendo material pós-sináptico fixado na sua superfície externa (Gray & Whittaker, 1962). Estas estruturas que mantêm a propriedade de libertar neurotransmissores de um modo dependente do Ca^{2+} (Nicholls, 1989) possuem um potencial de membrana fisiológico estável (Scott & Nicholls, 1980) e preservam uma compartimentação intra-terminal intacta constituída por mitocôndrias, retículo endoplasmático e vesículas sinápticas (Gray & Whittaker, 1962). Os sinaptossomas retêm a função pré-sináptica dos terminais nervosos intactos, possuindo as propriedades bioquímicas, eletrofisiológicas e morfológicas do componente pré-sináptico, nomeadamente possuem vários mecanismos altamente eficazes de regulação de Ca^{2+} intracelular (Miller, 1991).

Neste trabalho prepararam-se sinaptossomas de hipocampo de doentes com epilepsia MTLE e de cadáver humano, de acordo com o procedimento descrito por Whittaker (1965) e Helme-Guizon (1998) e posteriormente modificado por Bancila (2009). Apesar deste método resultar na obtenção de sinaptossomas menos puros (com maior grau de contaminação da componente pós sináptica) que os obtidos pelo método de Percoll foi, no entanto, o escolhido uma vez que aquele leva à obtenção de sinaptossomas com menor viabilidade. Quando o objetivo de um trabalho passa pela deteção de mecanismos neuromoduladores, como é o caso de estudos funcionais (que decorreram em paralelo aos estudos de expressão proteica no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS-UP) a estabilidade da preparação é um fator essencial para a visualização de efeitos que podem não ser muito pronunciados. De maneira a validar estes sinaptossomas como modelo experimental de amostras enriquecidas no componente pré-sináptico (enriquecidas em terminais nervosos) fez-se uma avaliação das componentes glial e pré-sináptica nestas amostras por *Western blotting* (Figura 3).

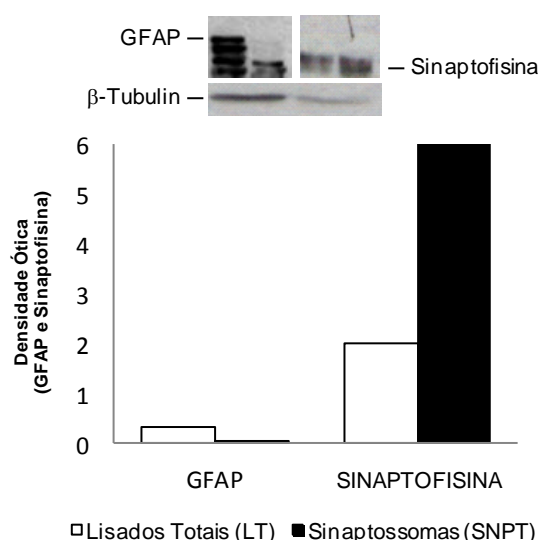


Figura 3 – Validação dos sinaptossomas como modelo experimental. Avaliação da componente glial (anti-GFAP) e pré-sináptica (anti-Sinaptofisina) em lisados totais (LT) versus sinaptossomas (SNPT) de tecido cerebral humano de um indivíduo controle.

Como seria de esperar, e como se pode verificar pela Figura 3, a fração sinaptossomal encontra-se enriquecida em terminais nervosos (enriquecimento de 4x em sinaptofisina - marcador de vesículas sinápticas) relativamente aos lisados totais (enriquecimento de 8x em GFAP - marcador glial) o que parece validar estas amostras para o seu uso no trabalho experimental subsequente.

2.3 - Imunolocalização por microscopia confocal

2.3.1 – Preparação dos tecidos

2.3.1.1 - Fixação e Preservação dos tecidos

No presente trabalho, utilizou-se como fixador uma solução de 4% formaldeído em tampão fosfato (PBS: 137mM NaCl, 2.6mM KCl, 4.3mM Na₂HPO₄, 1.5mM KH₂PO₄, pH 7.4). As amostras de tecido cerebral (duas de cadáver e uma de doente com MTLE) foram fixadas durante 48 horas a 4°C e posteriormente lavadas com PBS, realizando-se 3 ciclos de lavagem de 10 minutos cada. Seguidamente, os tecidos foram crioprottegidos com uma solução de sacarose 30% em PBS durante 24 horas a 4°C e congelados em azoto líquido após terem sido envolvidos numa matriz de congelamento rápido (Shandon Cryomatrix; Thermo Scientific). Finalmente os tecidos foram armazenados a -80°C para posterior utilização.

2.3.1.2 - Seccionamento

Na altura do seccionamento do tecido este foi removido da arca a -80°C e colocado num criostato (Leica CM1850) a -25°C durante 30 minutos para estabilização da temperatura. Seguidamente, e depois do tecido devidamente orientado, cortaram-se secções com 30 μm de espessura as quais foram colocadas *free-floating* em PBS em placas de cultura de células de 24 poços.

2.3.1.3 – Tratamento com Negro de Sudão B

A autofluorescência biológica que advém de fluoróforos endógenos é uma propriedade intrínseca das células e tecidos, contudo, torna-se um obstáculo na imunolocalização de proteínas por imunofluorescência, e pode até mascarar ou mesmo interferir com sinais fluorescentes específicos (Del Castillo *et al*, 1989; Noonberg *et al*, 1992).

Em tecido cerebral de indivíduos idosos é muito frequente observar-se a acumulação de grânulos de lipofuscina nos neurónios. Uma das características desta substância, que resulta da degradação de organelos celulares danificados, é a autofluorescência. Sob excitação verde (514 nm) a lipofuscina emite comprimentos de onda na faixa do amarelo (550 nm) (Terman & Brunk, 1998). Assim tornou-se essencial reduzir a emissão da radiação proveniente desta substância de modo a possibilitar o uso de toda a gama de comprimentos de onda do espectro de luz. De entre vários reagentes utilizados para eliminar a autofluorescência, o Negro de Sudão B provou ser eficaz em vários tecidos, incluindo o cérebro (Dowson, 1982; Schnell *et al*, 1999).

Foi assim preparada uma solução de Negro de Sudão B 0.5% em etanol a 70% que permaneceu no escuro e foi filtrada com papel *Whatman* 3mm. Para bloquear a autofluorescência as secções de hipocampo de cérebro humano de doente MTLE e cadáver foram incubadas com Negro de Sudão B por 30 minutos à temperatura ambiente no escuro e com agitação contínua. De seguida, efetuaram-se 4 ciclos de lavagem de 10 minutos cada, duas com etanol a 70% e duas com PBS.

2.3.2 - Bloqueio e permeabilização

Após o processo de redução da autofluorescência as secções foram incubadas com um tampão de bloqueio (soro bovino fetal 10%, albumina sérica bovina 1%, Triton X-100 0,3%, NaN_3 0,05% em PBS), durante 1h à temperatura ambiente e com agitação contínua. O Triton X-100, que faz parte da composição do tampão de bloqueio, aumenta a permeabilidade das membranas facilitando desta forma a incubação dos tecidos com os anticorpos (Ramos-Vara *et al*, 2008). A incubação do tecido com o tampão de bloqueio

é essencial para impedir a formação de ligações inespecíficas do anticorpo primário, diminuindo a probabilidade de ocorrência de marcação inespecífica de fundo (Figura 4) (Ramos-Vara, 2005).

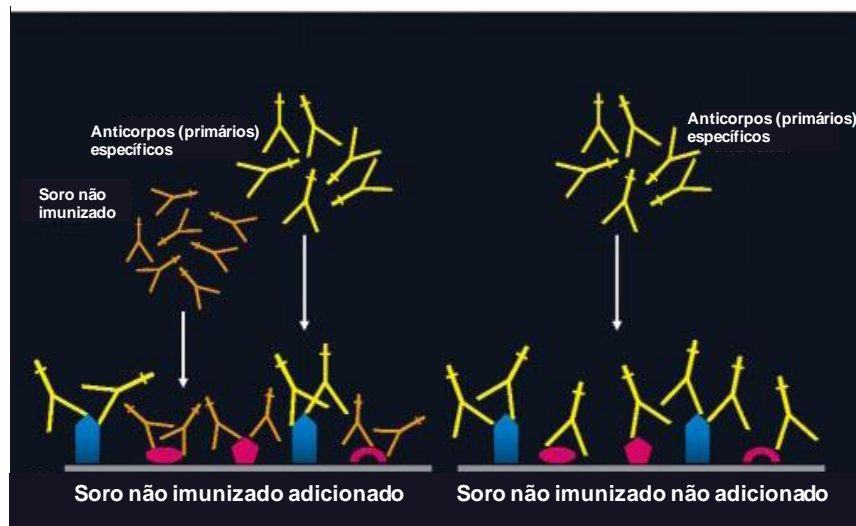


Figura 4 - Bloqueio de ligações inespecíficas. O soro normal, adicionado antes dos anticorpos primários (esquerda), bloqueia ligações inespecíficas do anticorpo primário. Quando não se utiliza o tampão de bloqueio (direita), o anticorpo primário pode ligar-se inespecificamente a antígenos no tecido, levando conseqüentemente à formação de marcação inespecífica de fundo (adaptado de (Ramos-Vara, 2005)).

2.3.3 - Marcação com anticorpos

Para visualizarmos a reação que ocorre entre o antígeno e o anticorpo recorreremos ao método de marcação indireta (Figura 5) no qual, um anticorpo primário se vai ligar ao antígeno de interesse, seguindo-se a aplicação de um anticorpo secundário acoplado a um fluoróforo que reconhece especificamente o anticorpo primário (Ramos-Vara, 2005).

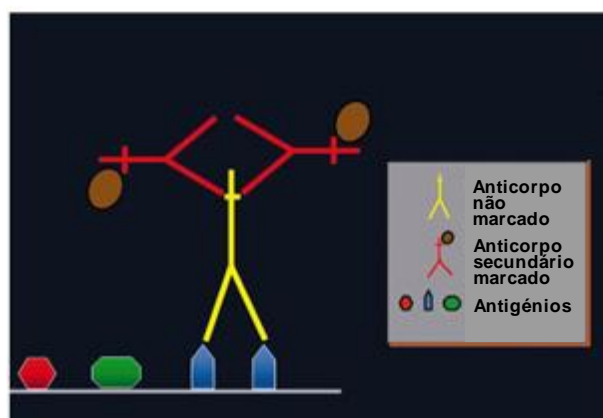


Figura 5 - Método de marcação indireta (adaptado de (Ramos-Vara, 2005)).

2.3.3.1 - Incubação com anticorpos primários

Depois do bloqueio e permeabilização, as amostras foram incubadas com os anticorpos primários escolhidos (ver Tabela 2), diluídos em tampão de incubação (soro bovino fetal 5%, albumina sérica bovina 1%, Triton X-100 0,3%, NaN_3 0,05% em PBS), a 4°C e durante 16 horas.

Após o período de incubação com os anticorpos primários, procedeu-se à lavagem dos tecidos com PBS/Triton X-100 0.3%, em 4 ciclos de 10 minutos, preparando as amostras para a marcação com os anticorpos secundários.

2.3.3.2 - Incubação com anticorpos secundários

Após a lavagem dos anticorpos primários, as amostras foram incubadas com os anticorpos secundários fluorescentes.

Os anticorpos secundários utilizados devem ser escolhidos tendo em conta o hospedeiro do anticorpo primário uma vez que irão reconhecer especificamente as imunoglobulinas deste. Outro aspeto importante é a escolha do fluoróforo acoplado ao anticorpo secundário. Em particular, o fluoróforo escolhido deve ser suficientemente sensível para o comprimento de onda de excitação utilizado. Há ainda que ter em conta o efeito do próprio organismo no fluoróforo, isto é, o ambiente químico em que o fluoróforo se encontra pode afetar a posição dos picos dos espectros de absorção e emissão (Semwogerere & Weeks, 2005).

Os anticorpos secundários escolhidos (ver Tabela 2) foram diluídos no tampão de incubação referido no ponto anterior e incubados nas amostras durante duas horas à temperatura ambiente e com agitação contínua. Todos os procedimentos a partir do momento de adição destes anticorpos foram efetuados no escuro para evitar a excitação dos fluorocromos.

Após a incubação com os anticorpos secundários, procedeu-se à lavagem dos tecidos com PBS/Triton X-100 0.3%, em 4 ciclos de 10 minutos. No final, procedeu-se à montagem das secções entre lâmina e lamela de vidro com meio de montagem VectaShield suplementado com DAPI (VectorLabs). Fizeram-se ainda controlos negativos, por omissão dos anticorpos primários da solução de reação, que permitem avaliar o grau de ligações inespecíficas estabelecidas pelos anticorpos secundários (Ramos-Vara *et al*, 2008)

2.3.4 - Microscopia confocal

A microscopia confocal permite otimizar e melhorar a resolução de imagens obtidas por um microscópio convencional. Este microscópio utiliza um laser de excitação, com um comprimento de onda adequado, para fazer a iluminação ponto por ponto de uma determinada secção, sendo que através de um processo de restrição de diâmetro variável (*pinhole*) toda a fluorescência emitida que esteja fora do plano de focagem é rejeitada. Assim, o objetivo é capturar a imagem que se forma a partir do ponto de focagem escolhido. As imagens dos diferentes planos observados numa secção, são recebidas por um computador ligado ao microscópio confocal. O tratamento digital da imagem, para além de facilitar uma melhor observação de pequenos detalhes permite a construção de modelos tri-dimensionais da região de interesse, por conjugação de imagens sucessivas de diferentes planos da mesma amostra (Semwogerere & Weeks, 2005).

Neste trabalho, as lâminas de vidro, foram examinadas com um microscópio confocal de varrimento por laser Olympus FluoView FV1000, usando os seguintes lasers: um díodo de 405nm, que emite portanto, na gama dos 405nm e que possibilita excitar o DAPI; um Multi-line Argon, que emite na gama dos 488nm podendo portanto, excitar o fluoróforo Alexa Fluor 488; um laser de He-Ne, que emite no comprimento de onda de 543 nm e que vai excitar o fluoróforo Alexa Fluor 568, e ainda um laser de He-Ne, que emite a 633nm, o qual nos permitiu obter sinais inespecíficos provenientes de autofluorescência (marcação usada para subtrair à marcação de interesse) dado que não usámos qualquer fluorocromo com este comprimento de onda.

As imagens obtidas foram, posteriormente, tratadas usando o *software* associado ao microscópio confocal, o FluoViewer FV10-ASW1.2.

Tabela 2 – Anticorpos primários e secundários usados em imunofluorescência.

Anticorpo primário	Hospedeiro	Diluição	Anticorpo secundário	Diluição
Recetor A ₁ da adenosina (Chemicon)	Coelho (rb)	1:250	Alexa Flúor 488 Burro anti-rb IgG (Molecular Probes)	1:1500
Neurofilamento 200kDa (NF200) (abcam)		1:900	Alexa Flúor 568 Burro anti-rb IgG (Molecular Probes)	
Sinaptotagmina (SiT) (SynapticSystems)		1:400		
Proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Dako)		1:600		
Recetor A _{2A} da adenosina (Chemicon)	Rato (ms)	1:450	Alexa Flúor 488 Burro anti-ms IgG (Molecular Probes)	
Proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Chemicon)		1:600	Alexa Flúor 568 Burro anti-ms IgG (Molecular Probes)	
Neurofilamento 160kDa (NF160) (abcam)		1:800		
Sinaptofisina (SiF) (Chemicon)		1:500		

III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Identificação das diversas regiões do hipocampo humano

O hipocampo é essencialmente uma faixa curva de córtex filogeneticamente primitivo (“arquicórtex”), localizada na porção medial do lobo temporal. Medial e inferiormente, o hipocampo é contíguo ao subículo, o pré-subículo e o para-subículo, repousando sobre o córtex entorrinal e giro parahipocampal (Brodal & Bjaalie, 1997). O termo “hipocampo” é comumente utilizado para descrever conjuntamente duas regiões contíguas interligadas: o giro dentado (GD) e o hipocampo propriamente dito (“Corno de Amon”; CA). Ambos possuem uma organização interna em camada tripla, composta por dois tipos de células principais: as células granulares do giro dentado e as células piramidais do Corno de Amon. O Corno de Amon é, por sua vez, subdividido em 4 regiões, CA1-4. O GD é composto pelos estratos molecular e granuloso (assim chamado por conter os corpos celulares das células granulares as quais constituem os principais neurónios excitatórios desta área). Internamente ao estrato granuloso encontra-se o hilo (também designado por estrato multiforme ou polimórfico). Este estrato é frequentemente considerado como independente do GD e muitas vezes referido como CA4 (Forster *et al*, 2006).

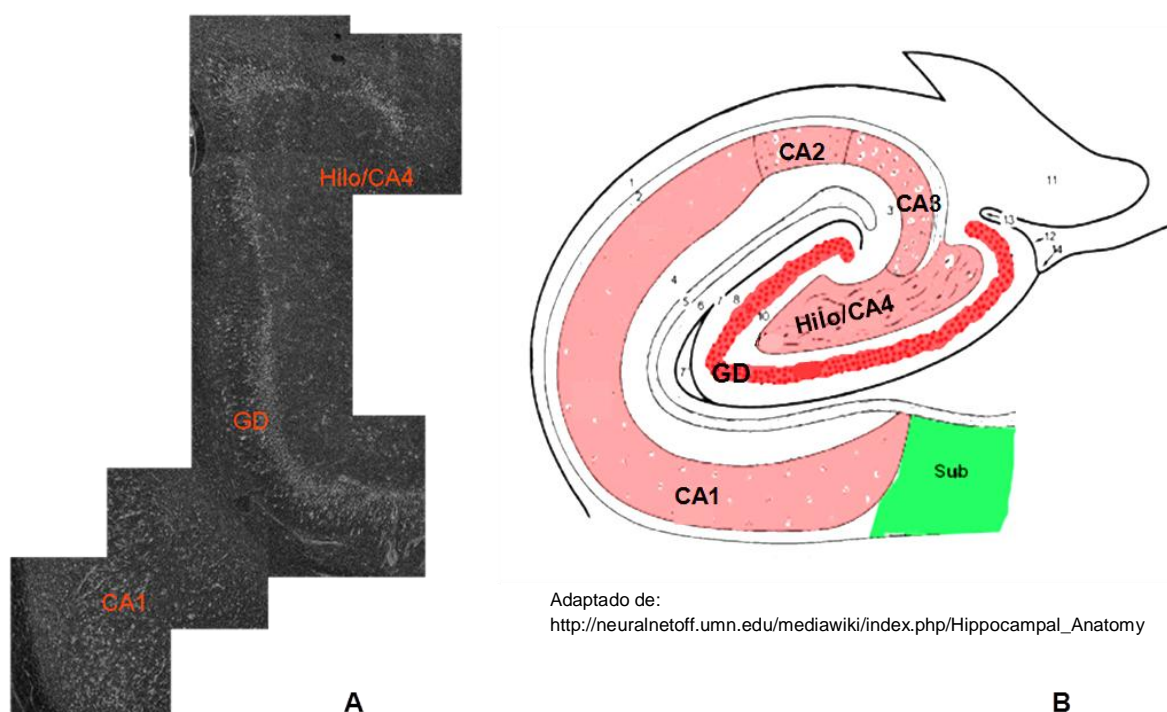


Figura 6 - Imagens ilustrativas da formação hipocampal. **(A)** Imagem de um corte coronal do hipocampo humano obtida por contraste de interferência diferencial. **(B)** Diagrama esquemático da estrutura do hipocampo. CA1-4 - Setores do Corno de Amon; GD - Giro dentado; Sub - Subículo.

Na Figura 6A é possível observar uma imagem de um corte coronal de hipocampo de um indivíduo controlo obtida por contraste de interferência diferencial com algumas regiões identificadas. Devido à dimensão do hipocampo humano (comparativamente com o dos roedores usados habitualmente nas experiências), foi necessário recolher várias imagens microscópicas parcelares e corrigi-las na montagem final apresentada. Na Figura 6B, encontra-se ilustrado um diagrama esquemático da estrutura do hipocampo para uma melhor compreensão visual das regiões identificadas experimentalmente.

3.2 – Padrão anatomopatológico do hipocampo de doentes com MTLE: esclerose hipocampal

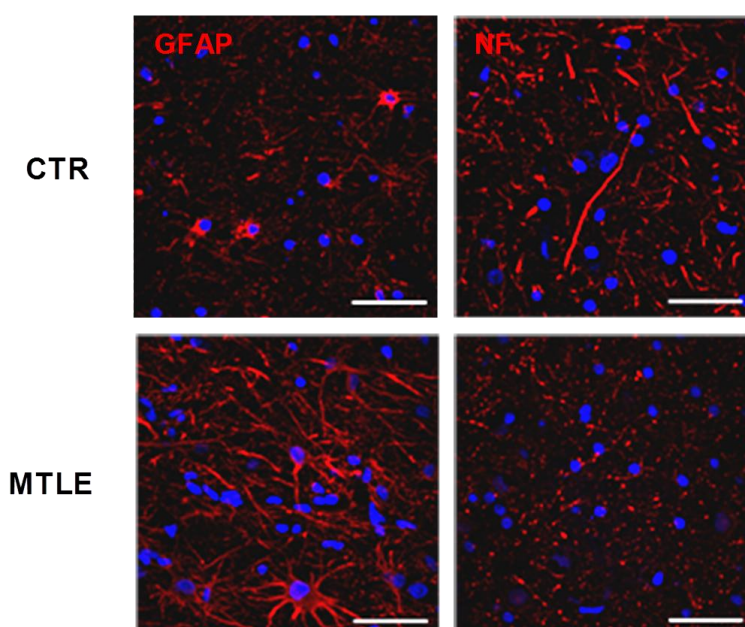


Figura 7 – Imagens representativas de esclerose hipocampal (região hilo/CA4) num doente com MTLE comparativamente com o hipocampo de um indivíduo controlo. Os astrócitos foram marcados com um anticorpo anti-GFAP e as fibras neuronais foram marcadas com um anticorpo anti-NF. Observa-se no hipocampo MTLE perda neuronal acompanhada de intensa astrogliose. Barra de escala = 50µm.

Na Figura 7, podem-se observar alguns aspetos relacionados com a esclerose hipocampal. Na região hipocampal hilo/CA4 do doente com MTLE observa-se uma perda neuronal significativa, detetada pela redução da imunoreatividade para o neurofilamento (NF), que é acompanhada de intensa astrogliose (aumento do número de astrócitos imunoreativos para o marcador glial GFAP) (Borges *et al*, 2003), comparativamente com a mesma região no hipocampo de controlo cadavérico. Observa-se, ainda, uma alteração marcada na morfologia das células marcadas positivamente com GFAP, estas aumentam

de tamanho e apresentam maior complexidade no arranjo da proteína fibrilar acídica (GFAP) no seu interior.

3.3 – Expressão e localização dos recetores A_1 e A_{2A} da adenosina no hipocampo de indivíduos controlo e de doentes com MTLE

3.3.1 – Recetor A_1

3.3.1.1 – Análise da expressão proteica

Foram analisados os níveis de expressão proteica do recetor A_1 da adenosina em lisados totais e terminais nervosos (sinaptossomas) isolados do hipocampo de doentes com MTLE e de indivíduos controlo. Os resultados (Figura 8) mostram que nos doentes com MTLE os níveis de expressão do recetor A_1 se encontram diminuídos comparativamente com os controlos. Este fato foi verificado tanto nos lisados totais (40% do controlo) como nos sinaptossomas (50% do controlo) do hipocampo humano.

Curiosamente, os resultados também permitem constatar que existe uma maior expressão de recetores A_1 nos lisados totais comparativamente com os sinaptossomas dos indivíduos controlo (1,6 vezes); esta relação atenua-se nos doentes MTLE (1,2 vezes). Estes dados sugerem que os recetores A_1 não estão confinados à componente neuronal no cérebro humano, podendo também encontrar-se expressos em células não-neuronais, provavelmente em células gliais (Biber *et al*, 1997; Gebicke-Haerter *et al*, 1996; Haselkorn *et al*, 2010; Tsutsui *et al*, 2004; van Calker & Biber, 2005)

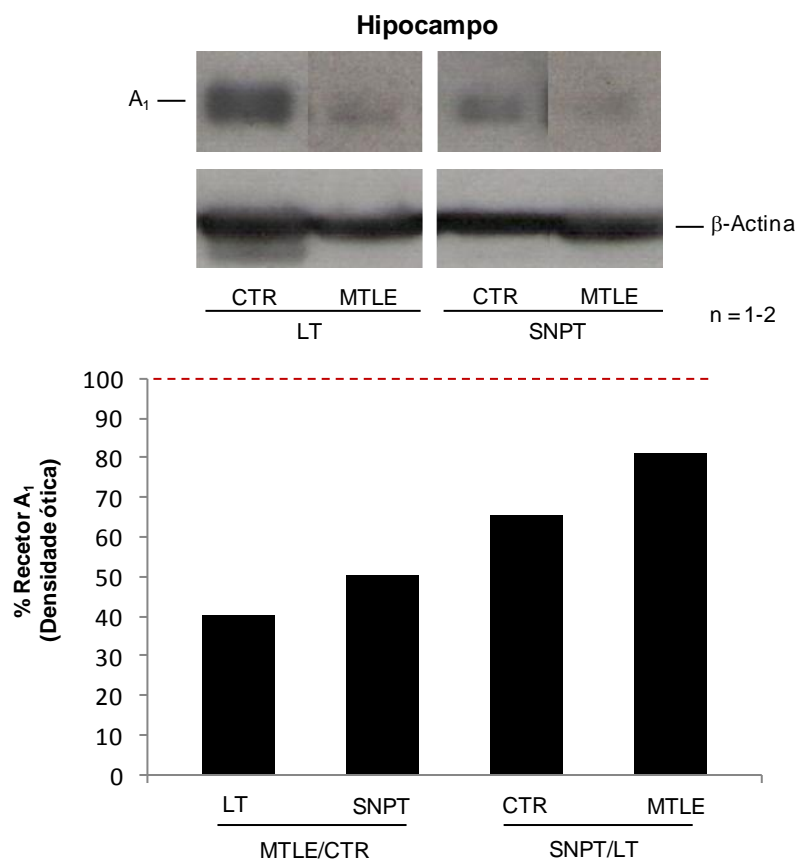


Figura 8 – Avaliação dos níveis de expressão proteica do recetor A₁ em hipocampo de indivíduos controlo e doentes com MTLE por WB. O histograma mostra as percentagens dos níveis de expressão proteica do recetor A₁ da adenosina (39 kDa) em lisados totais vs sinaptossomas de hipocampo de indivíduos controlo e doentes com MTLE. A quantidade de proteína carregada nos géis foi de 75µg/poço. A deteção imunológica foi realizada com recurso ao anticorpo anti-A₁ (Abcam; 1:500).

3.3.1.2 – Imunolocalização por microscopia confocal

Em conformidade com os resultados obtidos na análise de expressão proteica, verificou-se uma redução da imunoreatividade do recetor A₁ no hipocampo dos doentes com MTLE comparativamente com controlos cadavéricos. Esta redução foi mais acentuada na região do hilo/CA4 do que no giro dentado (Figura 9) e está de acordo com as evidências que provam uma perda neuronal significativa na zona dos neurónios polimórficos da região hilar e dos neurónios piramidais da região CA4 (núcleos mais pequenos corados com DAPI nas imagens da Figura 9), com relativa preservação do giro dentado em doentes com esclerose hipocampal (Babb, 1987; Margerison & Corsellis, 1966). A perda neuronal associada à redução dos níveis de expressão dos recetores inibitórios A₁ da adenosina pode justificar a tendência para a hiperexcitabilidade desta região que é característica dos doentes com epilepsia do tipo MTLE.

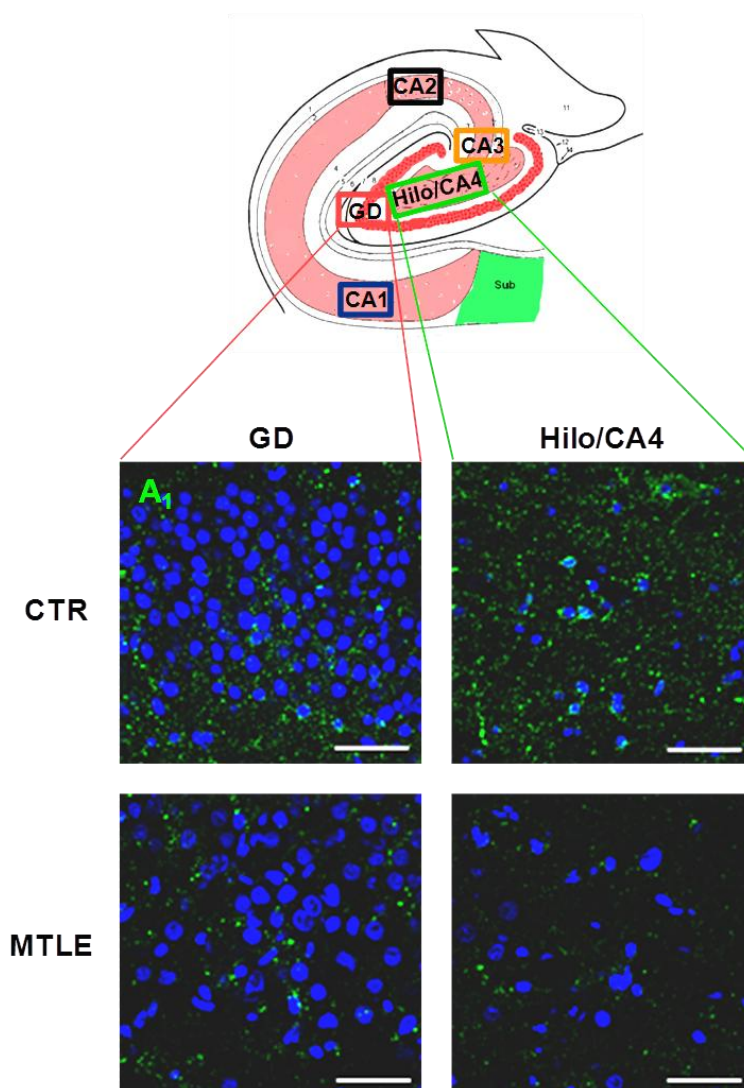


Figura 9 - Comparação da imunoreatividade do recetor A_1 no giro dentado (GD) e no Hilo/CA4 do hipocampo de um indivíduo controlo e de um doente com MTLE. Observa-se uma diminuição da densidade de expressão do recetor A_1 tanto no GD como no Hilo/CA4 do hipocampo do doente com MTLE. Barra de escala = 50 μ m.

Relativamente à localização celular do recetor A_1 , a análise de expressão proteica comparando os resultados obtidos nos lisados totais com os terminais nervosos isolados (sinaptossomas) do hipocampo sugeria a presença destes recetores em células não neuronais, muito provavelmente gliais. Esta hipótese concorda com os resultados dos ensaios de imunolocalização que mostram a presença do recetor A_1 em células imunorreativas para o GFAP (Figura 10 e 11, coloração amarela nas imagens de colocalização), para além da sua expressão ser evidente nos terminais nervosos marcados com sinaptofisina (SiF), uma proteína da maquinaria exocitótica e, portanto, do componente pré-sináptico (Figura 10, maior pormenor na Figura 11). Os resultados deste

trabalho não permitem, no entanto, excluir o fato do recetor A_1 se poder localizar também a nível pós-sináptico (Fredholm *et al*, 2005b), o que explicaria a imunorreatividade A_1 em células com marcação negativa para o marcador glial (GFAP) e, também, para o marcador pré-sináptico (SiF); o esclarecimento desta dúvida requer a realização de experiências de imunolocaliação entre o recetor A_1 e a proteína associada à guanilato cinase, PSD-95, um marcador típico da densidade pós-sináptica.

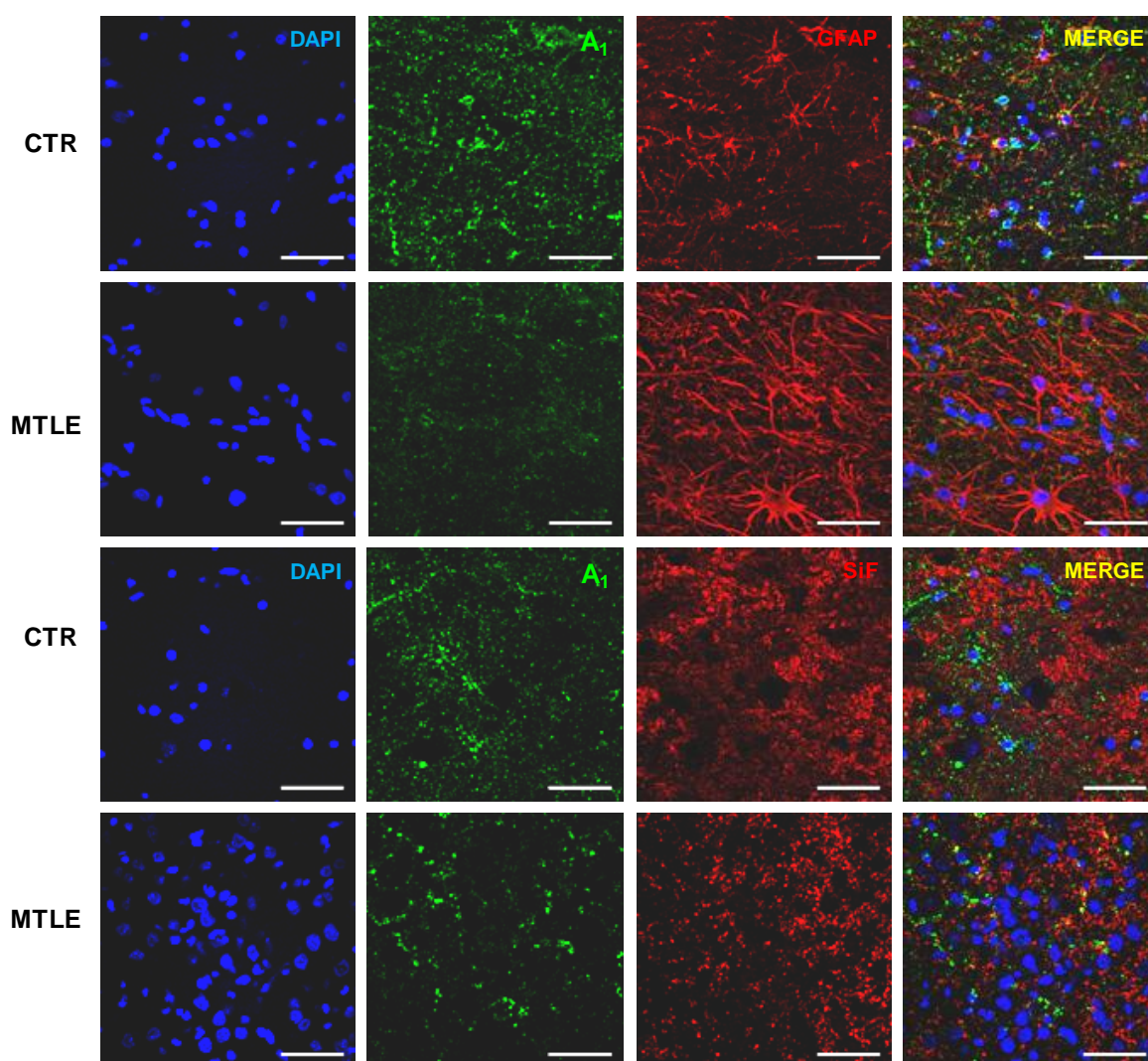


Figura 10 - Avaliação da localização celular do recetor A_1 na região hilar/CA4 do hipocampo humano. Imunoreatividade do recetor A_1 (verde) em células reativas para marcadores de terminais nervosos, SiF, e de células gliais, GFAP, no hipocampo de um doente com MTLE e de um indivíduo controlo. Note-se a intensa astrogliose observada nas secções do doente MTLE, detetada pelo aumento do número de células com núcleo menos denso e de maiores dimensões (coloração pelo DAPI) imunoreativas para o GFAP. Barra de escala = 50 μ m.

Curiosamente, apesar da intensa astrogliose observada na região hilar/CA4 do hipocampo dos doentes com MTLE (Figura 10, imunoreatividade para o GFAP) a densidade global da expressão do recetor A_1 naquela região do hipocampo diminuiu significativamente. A diminuição concomitante do número de neurónios que expressam o recetor A_1 , por si só, não explica tal redução na marcação A_1 observada nos doentes. É,

portanto, plausível que a intensa proliferação astrocítica tenha submetido estas células a um processo de (des)diferenciação acompanhada de perda da capacidade de expressar recetores inibitórios A_1 da adenosina na membrana celular. Esta hipótese foi plenamente confirmada na Figura 10, já que as células GFAP-positivas na região hilar/CA4 do hipocampo do doente MTLE não apresentam imunoreatividade para o recetor A_1 .

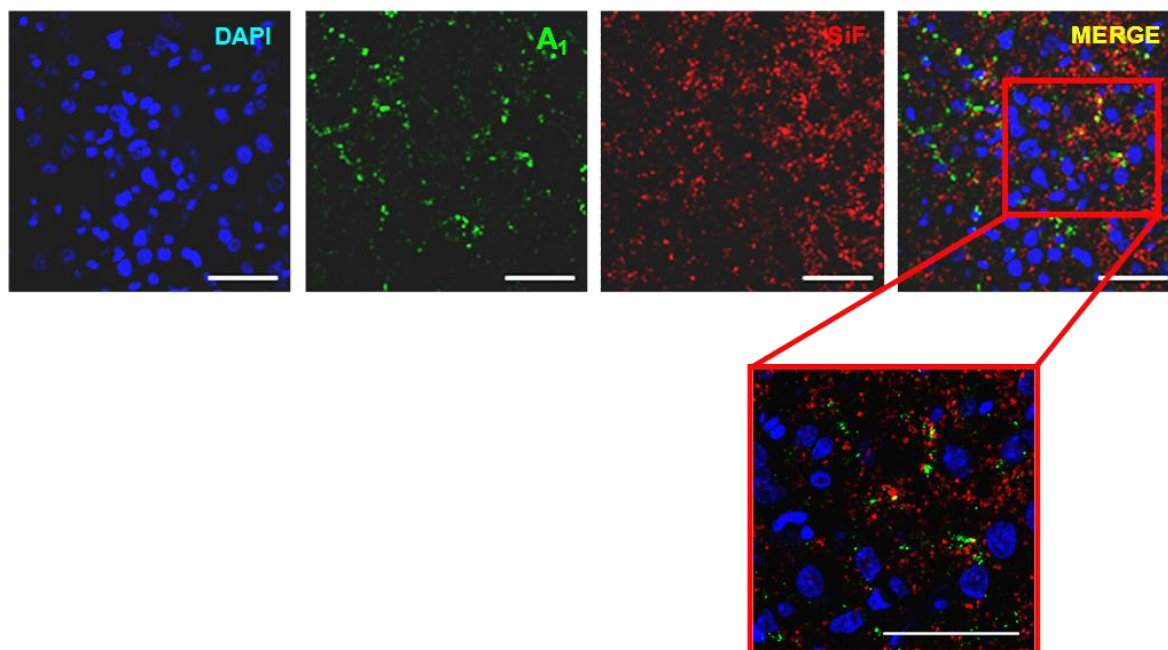


Figura 11 – Pormenor da colocalização do recetor A_1 com o marcador de terminais nervosos SiF numa seção do hipocampo de um doente com MTLE. Barra de escala = 50 μ m.

3.3.2 – Recetor A_{2A}

3.3.2.1 – Análise da expressão proteica

Na figura 12, mostram-se os resultados da avaliação da expressão proteica do recetor A_{2A} no hipocampo de um doente com MTLE e de um controlo cadavérico realizados nas mesmas condições experimentais (quantidade de proteína carregada por poço foi de 100 μ g). Os resultados mostram que a expressão do recetor A_{2A} da adenosina é claramente superior no doente com MTLE do que no controlo cadavérico. Esta diferença foi observada tanto nos lisados totais como nos terminais nervosos isolados (sinaptossomas), com uma tendência mais expressiva nos lisados totais (9,5 vezes) do que nos sinaptossomas (6 vezes). A expressão do recetor A_{2A} parece ser, à partida, maior nos lisados totais (3 vezes) quando comparada com os sinaptossomas do hipocampo humano. A relação entre a expressão do recetor A_{2A} nos lisados totais e nos sinaptossomas aumenta para 4,5 vezes no hipocampo dos doentes com MTLE (Figura

12). No seu conjunto, estes dados sugerem que no hipocampo humano, à semelhança do que acontece nos roedores, o recetor A_{2A} localiza-se predominantemente em células não-neuronais (e.g. astrócitos, microglia, endotélio vascular) (Fiebich *et al*, 1996; Kust *et al*, 1999; Coney & Marshall, 1998; Ngai *et al*, 2001), embora também possa existir nos terminais nervosos (Li *et al*, 2001; Nishizaki *et al*, 2002; Rebola *et al*, 2005a).

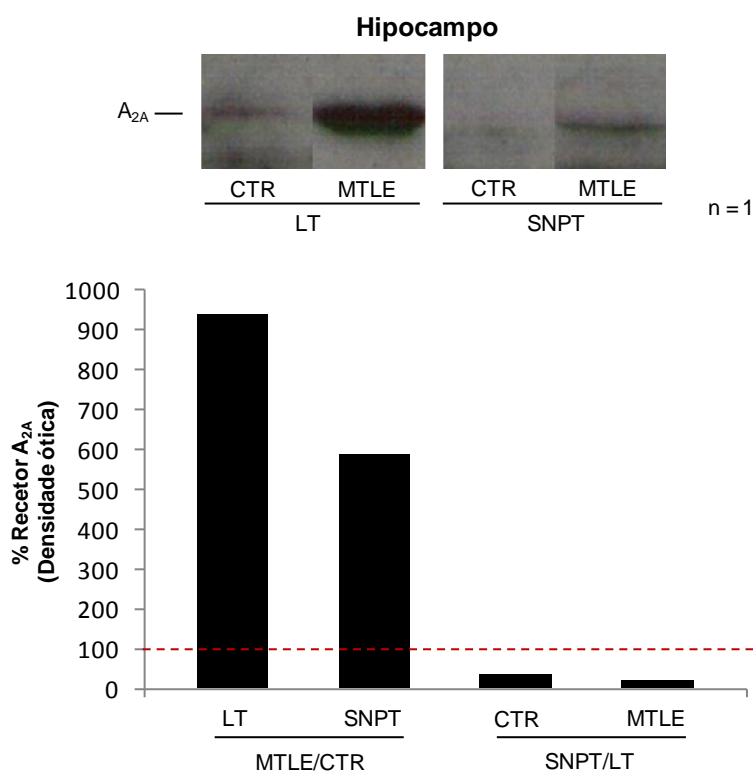


Figura 12 – Avaliação dos níveis de expressão proteica do recetor A_{2A} em hipocampo de indivíduos controlo e doentes com MTLE por WB. O histograma mostra as percentagens dos níveis de expressão proteica do recetor A_{2A} da adenosina (55 kDa) em lisados totais vs sinaptossomas de hipocampo de indivíduos controlo e doentes com MTLE. A quantidade de proteína carregada nos géis foi de 100µg/poço. A deteção imunológica foi realizada com recurso ao anticorpo anti- A_{2A} (Alpha Diagnostic; 1:250).

3.3.2.2 – Imunolocalização por microscopia confocal

No hipocampo dos doentes com MTLE observa-se um aumento da expressão do recetor A_{2A} comparativamente com o controlo cadavérico (Figura 13). Este resultado vai no mesmo sentido do obtido nas experiências de avaliação da expressão proteica do recetor A_{2A} (Figura 12). Na Figura 13, pode constatar-se que o aumento da expressão dos recetores A_{2A} no hipocampo do doente MTLE é mais acentuado na região do hilo/CA4 e no giro dentado (GD) do que nas regiões CA1 e CA3. Do ponto de vista anatomopatológico a esclerose hipocampal caracteriza-se por perda neuronal e gliose. Os neurónios das regiões CA1 e hilar/CA4 são os mais afetados (Babb, 1987; Margerison & Corsellis, 1966). Resultados obtidos neste trabalho mostram que, para além da perda neuronal, se pode observar intensa astrogliose na região hilar/CA4 adjacente ao GD,

interessando por isso investigar em que tipo(s) de célula(s) a expressão do recetor A_{2A} seria mais evidente.

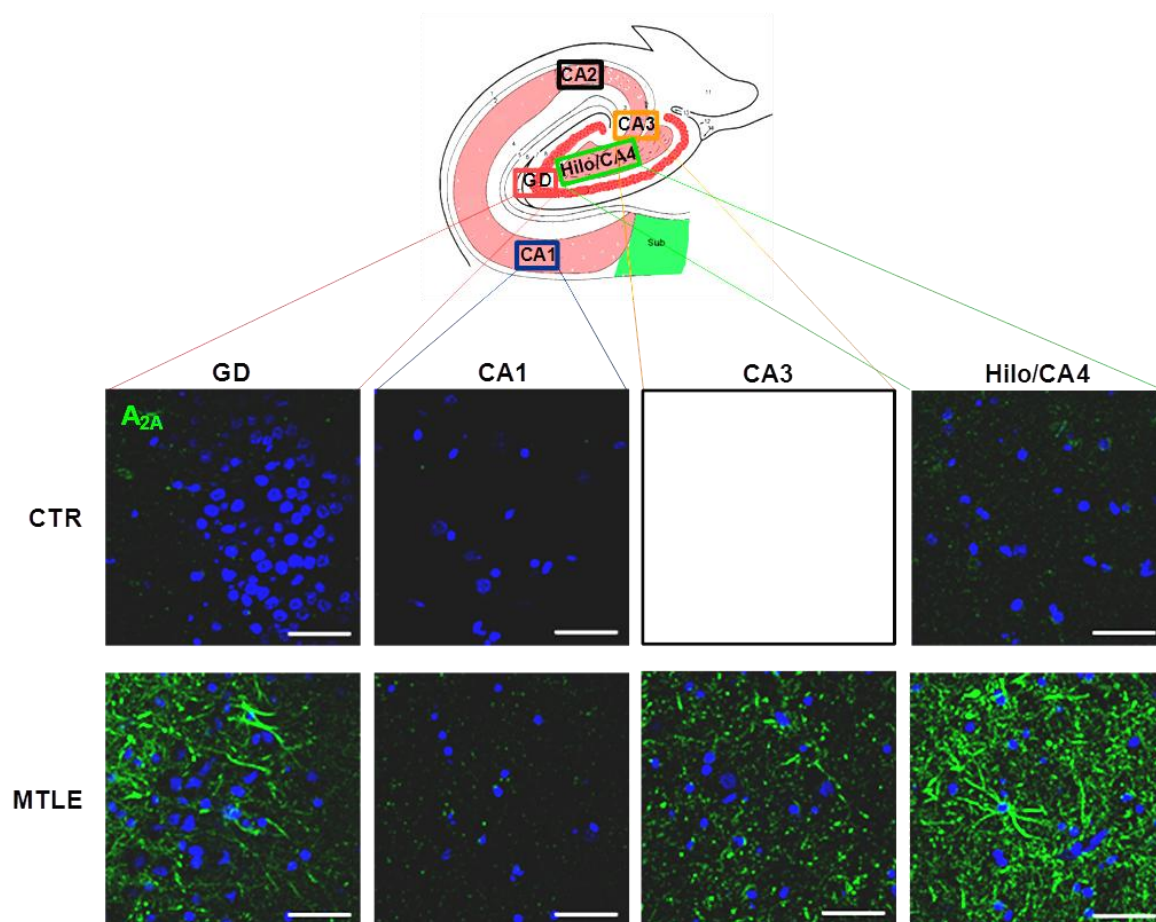


Figura 13 - Comparação da imunoreatividade do recetor A_{2A} nas regiões giro dentado (GD), corno de Amon (CA1 e CA3) e Hilo/CA4 do hipocampo de um indivíduo controlo e de um doente com MTLE. Observa-se um aumento significativo da expressão do recetor A_{2A} que é particularmente evidente nas regiões GD e hilo/CA4 do hipocampo no doente MTLE. Barra de escala = 50 μ m.

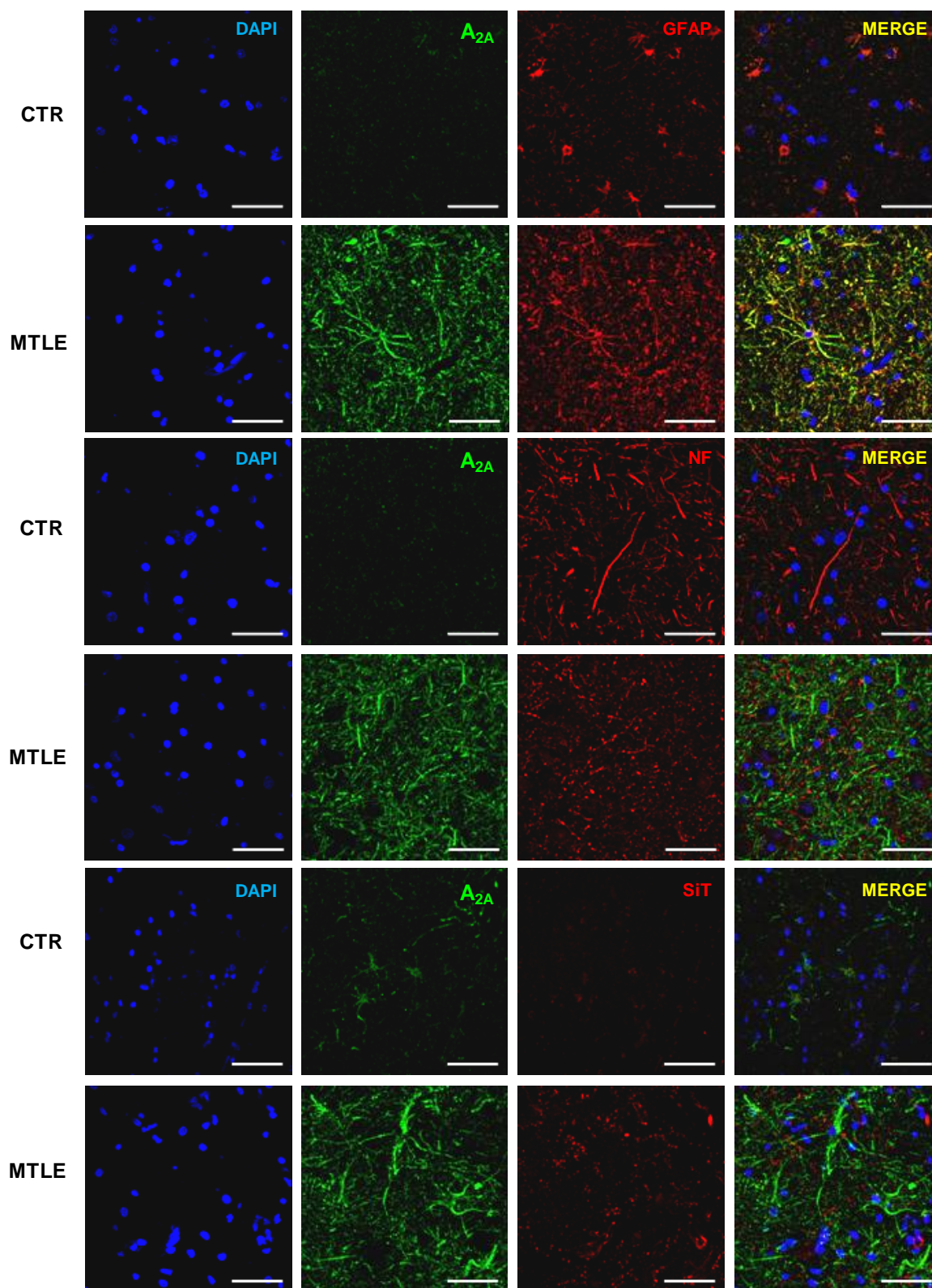


Figura 14 - Avaliação da localização celular do recetor A_{2A} na região hilar/CA4 do hipocampo humano. Imunoreatividade do recetor A_{2A} (verde) em células reativas para marcadores de terminais nervosos, NF e SiT, e de células gliais, GFAP, no hipocampo de um doente com MTLE e de um indivíduo controlo. Note-se que a intensa astrogliose (marcação positiva para GFAP) observada nas secções do doente MTLE se correlaciona com o aumento da imunoreatividade para o recetor A_{2A} da adenosina. Barra de escala = 50µm.

Na Figura 14, mostra-se claramente que o aumento da imunoreatividade do recetor A_{2A} no hipocampo dos doentes MTLE se faz à custa da sua expressão em células marcadas positivamente para o GFAP, acompanhando o processo de astrogliose descrito anteriormente. Note-se que a marcação A_{2A} no hipocampo do controlo cadavérico é muito reduzida, comparativamente com o sinal observado para o recetor A_1 (ver Figura 10). Neste contexto, importa salientar que o recetor inibitório A_1 predomina no hipocampo dos controlos cadavéricos e que a sua expressão diminui nos doentes MTLE, para dar lugar ao aumento da expressão dos recetores excitatórios do subtipo A_{2A} , principalmente nas células gliais marcadas positivamente para o GFAP. Os resultados deste trabalho mostram claramente e pela primeira vez que a (des)diferenciação dos astrócitos durante a gliose hipocampal característica do fenómeno epileptogénico se faz acompanhar da substituição dos recetores inibitórios A_1 (característica dos indivíduos controlo) pela sobreexpressão dos recetores excitatórios A_{2A} da adenosina nos doentes com MTLE. Trabalhos futuros deverão avaliar o significado fisiopatológico desta alteração.

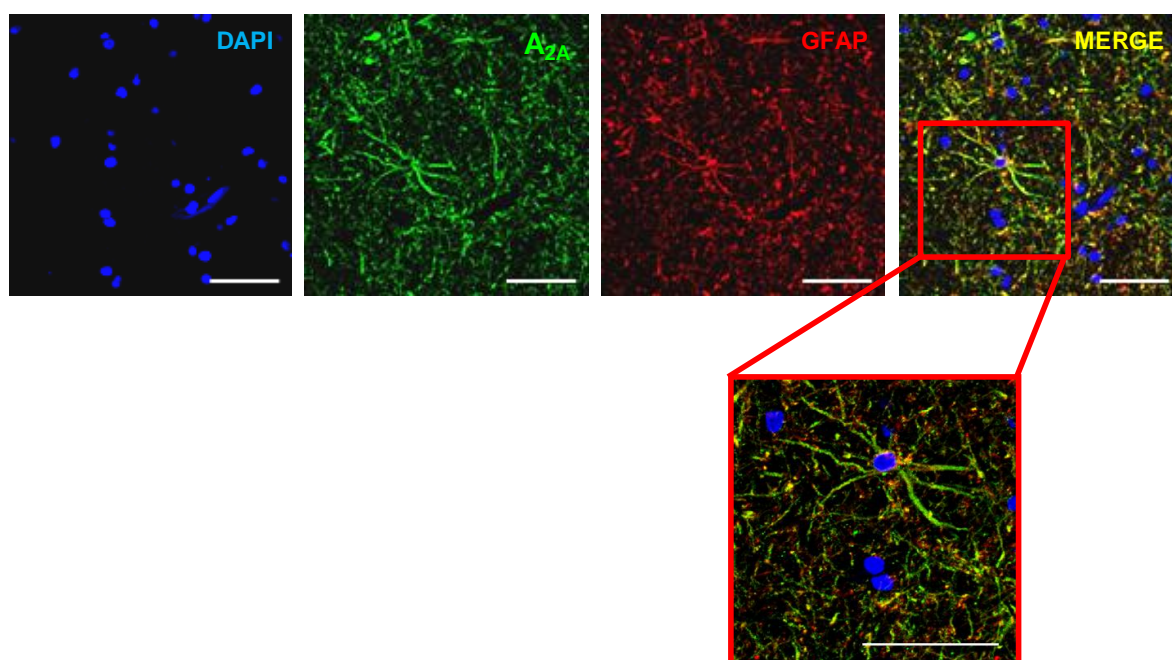


Figura 15 - Pormenor da colocalização do recetor A_{2A} com o marcador de células gliais, GFAP, numa seção do hipocampo de um doente com MTLE. Barra de escala = 50µm.

Na Figura 14, mostra-se que as células neuronais positivas para o NF e para a proteína pré-sináptica sinaptotagmina (SiT) não exibem imunoreatividade para o recetor A_{2A} da adenosina. A expressão preferencial dos recetores A_{2A} nas células gliais (marcadas positivamente para o GFAP), que é particularmente evidente nos doentes MTLE (Figura 14, pormenor realçado na Figura 15), consolida a hipótese avançada pela

análise dos níveis de expressão proteica (Figura 12). Naquelas experiências, verificou-se que o aumento da expressão do recetor A_{2A} da adenosina no doente com MTLE é mais evidente nos lisados totais (9.5 vezes o controlo) do que nos terminais nervosos isolados (6 vezes o controlo) mostrando que estes recetores se localizam preferencialmente em células não-neuronais, muito provavelmente gliais.

CONCLUSÃO

As crises epiléticas são tradicionalmente vistas como um desequilíbrio entre a transmissão excitatória e inibitória nos circuitos cerebrais, no qual a hiperexcitação ou a hipoinibição podem resultar num disparo repetitivo anormal dos circuitos cerebrais (Meldrum & Rogawski, 2007). Esta visão reducionista do fenómeno epiletogénico mantém-se válida apenas para o controlo das crises convulsivas, mas está longe da conceção hoje aceite dos processos eletrofisiológicos (e.g. plasticidade sináptica, difusão da atividade elétrica cerebral) e anatomopatológicos (e.g. alteração da morfologia, apoptose/morte neuronal, proliferação glial, inflamação cerebral) subjacentes à epiletogénese.

A adenosina é considerada um importante modulador da atividade cerebral em várias vertentes (e.g. controlo da atividade neuronal, regulação do metabolismo e da perfusão cerebral, papel na inflamação cerebral) e, como tal, tem sido apresentada como um antiepilético endógeno, muito embora a maioria dos estudos subjacentes a esta análise tenham sido realizados em modelos animais. Ora, atendendo à cronicidade do fenómeno epiletogénico e às diferenças intrínsecas aos modelos animais comparativamente ao fenómeno no Homem, urge desenvolver esforços no sentido de estudar as alterações fisiopatológicas no tecido humano epilético. Neste trabalho avaliaram-se os níveis de expressão e a localização celular dos dois recetores da adenosina considerados mais abundantes no cérebro A_1 e A_{2A} , que por sinal também apresentam maior afinidade para o nucleósido, no hipocampo humano. Neste estudo, utilizaram-se amostras de hipocampo de cadáver proveniente de autópsias médico-legais e de doentes portadores de epilepsia fármaco-resistente do tipo MTLE submetidos a cirurgia ablativa do foco epileptogénico.

A escolha do hipocampo prendeu-se com o fato desta região cerebral ser especialmente suscetível à lesão que deriva da libertação de substâncias excitotóxicas tal como o glutamato, que acontece durante as crises convulsivas recorrentes. Também pesou o fato do hipocampo possuir uma grande densidade de terminações nervosas excitatórias (Auer & Siesjo, 1988; Olney *et al*, 1983) e da sua estrutura / atividade se encontrar particularmente alterada num grande número de doentes com epilepsia fármaco-resistente do tipo MTLE. É importante referir que dada a enorme limitação em termos de obtenção de tecido cerebral humano, em particular de hipocampo, as experiências efetuadas estão em parte incompletas e por outro lado também carecem de confirmação. As peças usadas no estudo nem sempre se apresentavam nas melhores condições e grande parte não continha a estrutura do hipocampo completa o que justifica

por vezes a ausência de imagens de imunolocalização na zona onde o dano provocado pela MTLE é descrito como tendo maior impacto (região do CA1). Assim, a estratégia seguida foi, de acordo com as regiões presentes na peça em estudo escolher (de entre regiões descritas como afetadas na MTLE: CA1, CA3, Hilo/CA4) aquela para a qual se verificaram resultados mais evidentes. De todas, o Hilo/CA4 foi a região eleita para descrever os resultados obtidos tanto para o recetor A_1 como A_{2A} .

Os resultados obtidos confirmaram os achados anatomopatológicos encontrados tradicionalmente no hipocampo dos doentes MTLE, nomeadamente no que respeita à perda da arquitetura normal do hipocampo devido à morte neuronal e à intensa astrogliose verificada sobretudo nas regiões de CA1 e Hilo/CA4, com relativa preservação das regiões CA2, CA3 e GD. Neste contexto, têm surgido dúvidas devido ao aparente paradoxo sobre como é possível que uma região empobrecida em neurónios possa gerar crises convulsivas. Diversos autores apontam a componente glial como aquela que poderá ter um papel essencial no desenvolvimento da doença, mercê da capacidade destas células reagirem, libertarem, captarem e metabolizarem inúmeros mediadores apontados como sendo importantes no fenómeno epiletogénico, desde logo neurotransmissores como o glutamato e o GABA, mas também neuromediadores como o ATP e a adenosina, fatores neurotróficos, citocinas inflamatórias, etc. Os resultados deste trabalho mostram claramente e pela primeira vez que a astrogliose associada à esclerose hipocampal humana parece acompanhar-se da (des)diferenciação dessas células por fenómenos ainda desconhecidos resultando, nomeadamente, na substituição dos recetores inibitórios A_1 da adenosina (característicos dos indivíduos controlo) por recetores excitatórios do subtipo A_{2A} evidenciados em grande abundância nos doentes com MTLE. Curiosamente, o grupo de D. Boison mostrou um aumento paralelo da atividade da cinase da adenosina (a enzima que fosforila intracelularmente o nucleósido em AMP) nas células gliais do hipocampo em modelos animais de epilepsia, justificando por esse fato a redução dos níveis de adenosina encontrados no meio extracelular e, por conseguinte, a sua atividade antiepilética. Para além disso, mostrou-se que o hipocampo dos animais epiléticos liberta intrinsecamente menor quantidade de ATP que os controlos e, também, parece que a atividade das ecto-NTPDases responsáveis pela conversão do ATP em adenosina está comprometida nos epiléticos. O significado fisiopatológico da mudança na sinalização purinérgica astrocitária durante o fenómeno epiletogénico agora tornada evidente está longe de ser conhecido, requerendo a sua exploração num futuro próximo.

Se não restam dúvidas sobre a importância da componente glial no fenómeno epiletogénico, por maioria de razão a perda neuronal verificada no hipocampo dos doentes epiléticos parece estar diretamente envolvida na epilepsia. Os resultados obtidos

neste estudo permitiram verificar uma diminuição da densidade dos recetores inibitórios A_1 expressos nas terminações nervosas (positivas para o marcador neuronal, SiF) no hipocampo dos doentes epiléticos comparativamente com os controlos cadavéricos. Este fenómeno parece acompanhar de perto a perda neuronal observada na região hilar/CA4 e, com menor preponderância, na região GD. Devido à escassez de tecido cerebral humano, não foi possível excluir nesta fase o envolvimento da região do CA1, assim como de outras regiões tradicionalmente menos afetadas pelo processo epiletogénico no hipocampo, como a CA2 e a CA3. Ainda assim, pode avançar-se que a redução da expressão do recetor inibitório A_1 da adenosina no hipocampo epilético humano pode estar relacionada com o aumento da excitabilidade neuronal naquela região cerebral e estar na base da epilepsia.

PERSPETIVAS FUTURAS

- Alargar o estudo das experiências de imunofluorescência aplicadas à microscopia confocal para as restantes zonas de interesse do hipocampo, nomeadamente CA1 e CA3. Alargar também este tipo de estudo ao neocórtex adjacente ao foco hipocampal uma vez que está descrito que procedimentos neurocirúrgicos onde ocorre a remoção do tecido cortical adjacente ao foco epilético hipocampal são acompanhados de uma recuperação mais favorável (Avoli *et al*, 2005) quando comparado com a remoção apenas do hipocampo esclerosado;
- Avaliação da existência de correlação entre os resultados dos estudos de expressão dos recetores da adenosina e ensaios funcionais realizados no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS-UP
 - Estudar o controlo purinérgico sobre os níveis intracelulares de Ca^{2+} em terminais nervosos isolados do cérebro (hipocampo e neocórtex adjacente) de doentes com MTLE comparativamente com indivíduos controlo.
 - Avaliar a libertação de ATP (bioluminescência) e adenosina (HPLC) no hipocampo humano (controlo vs MTLE), bem como realizar cinéticas de metabolização dos nucleótidos de adenina e da adenosina neste tecido. A distribuição das ecto-NTPDases, da ecto-5'-nucleotidase, da desaminase da adenosina e da cinase da adenosina, também poderia ser avaliada por microscopia confocal.
- A avaliação da atividade dos recetores A_1 e A_{2A} da adenosina em astrócitos em cultura isolados de indivíduos controlo e de epiléticos com MTLE poderia ajudar a esclarecer o seu papel no contexto da epilepsia, já que a sua expressão diferencial foi observada nos dois grupos de indivíduos.
- As tarefas sugeridas implicam um aumento do número de amostras de tecido cerebral processadas para garantir significado estatístico, objetivo que infelizmente não depende exclusivamente dos investigadores, mas sim de uma equipa multidisciplinar que é responsável pela seleção e colheita do tecido. Ora, como facilmente se pode antever, o ritmo das colheitas de tecido cerebral é o principal óbice à realização deste projeto, pelas razões éticas, clínicas, metodológicas e outras que se podem determinar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Abbracchio MP, Camurri A, Ceruti S, Cattabeni F, Falzano L, Giammarioli AM, Jacobson KA, Trincavelli L, Martini C, Malorni W, Fiorentini C (2001) The A3 adenosine receptor induces cytoskeleton rearrangement in human astrocytoma cells via a specific action on Rho proteins. *Ann N Y Acad Sci* **939**: 63-73

Abbracchio MP, Ceruti S, Brambilla R, Franceschi C, Malorni W, Jacobson KA, von Lubitz DK, Cattabeni F (1997) Modulation of apoptosis by adenosine in the central nervous system: a possible role for the A3 receptor. Pathophysiological significance and therapeutic implications for neurodegenerative disorders. *Ann N Y Acad Sci* **825**: 11-22

Allaman I, Lengacher S, Magistretti PJ, Pellerin L (2003) A2B receptor activation promotes glycogen synthesis in astrocytes through modulation of gene expression. *Am J Physiol Cell Physiol* **284**: C696-704

Ambrosio AF, Malva JO, Carvalho AP, Carvalho CM (1997) Inhibition of N-,P/Q- and other types of Ca²⁺ channels in rat hippocampal nerve terminals by the adenosine A1 receptor. *Eur J Pharmacol* **340**: 301-310

Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* **22**: 208-215

Arch JR, Newsholme EA (1978) Activities and some properties of 5'-nucleotidase, adenosine kinase and adenosine deaminase in tissues from vertebrates and invertebrates in relation to the control of the concentration and the physiological role of adenosine. *Biochem J* **174**: 965-977

Auer RN, Siesjo BK (1988) Biological differences between ischemia, hypoglycemia, and epilepsy. *Ann Neurol* **24**: 699-707

Avoli M, Louvel J, Pumain R, Kohling R (2005) Cellular and molecular mechanisms of epilepsy in the human brain. *Prog Neurobiol* **77**: 166-200

Babb TL, Kupfer WR, Pretorius JK, Crandall PH, Levesque MF (1991) Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. *Neuroscience* **42**: 351-363

Babb TLB (1987) Pathological findings in epilepsy. In Engel JJ, editor. *Surgical treatment of the epilepsy*, pp 511 - 514. New York: Raven Press

Bancila V, Cordeiro JM, Bloc A, Dunant Y (2009) Nicotine-induced and depolarisation-induced glutamate release from hippocampus mossy fibre synaptosomes: two distinct mechanisms. *J Neurochem* **110**: 570-580

Barraco RA, Clough-Helfman C, Goodwin BP, Anderson GF (1995) Evidence for presynaptic adenosine A2a receptors associated with norepinephrine release and their desensitization in the rat nucleus tractus solitarius. *J Neurochem* **65**: 1604-1611

Berman RF, Fredholm BB, Aden U, O'Connor WT (2000) Evidence for increased dorsal hippocampal adenosine release and metabolism during pharmacologically induced seizures in rats. *Brain Res* **872**: 44-53

Biber K, Klotz KN, Berger M, Gebicke-Harter PJ, van Calcar D (1997) Adenosine A1 receptor-mediated activation of phospholipase C in cultured astrocytes depends on the level of receptor expression. *J Neurosci* **17**: 4956-4964

Boison D (2005) Adenosine and epilepsy: from therapeutic rationale to new therapeutic strategies. *Neuroscientist* **11**: 25-36

Boison D (2007) Adenosine-based cell therapy approaches for pharmacoresistant epilepsies. *Neurodegener Dis* **4**: 28-33

Boison D (2008) The adenosine kinase hypothesis of epileptogenesis. *Prog Neurobiol* **84**: 249-262

Boison D, Chen JF, Fredholm BB (2010) Adenosine signaling and function in glial cells. *Cell Death Differ* **17**: 1071-1082

Boison D, Stewart KA (2009) Therapeutic epilepsy research: from pharmacological rationale to focal adenosine augmentation. *Biochem Pharmacol* **78**: 1428-1437

Bonan CD, Walz R, Pereira GS, Worm PV, Battastini AM, Cavalleiro EA, Izquierdo I, Sarkis JJ (2000) Changes in synaptosomal ectonucleotidase activities in two rat models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* **39**: 229-238

Borges K, Gearing M, McDermott DL, Smith AB, Almonte AG, Wainer BH, Dingledine R (2003) Neuronal and glial pathological changes during epileptogenesis in the mouse pilocarpine model. *Exp Neurol* **182**: 21-34

Borges K, McDermott D, Irier H, Smith Y, Dingledine R (2006) Degeneration and proliferation of astrocytes in the mouse dentate gyrus after pilocarpine-induced status epilepticus. *Exp Neurol* **201**: 416-427

Brand A, Vissienon Z, Eschke D, Nieber K (2001) Adenosine A(1) and A(3) receptors mediate inhibition of synaptic transmission in rat cortical neurons. *Neuropharmacology* **40**: 85-95

Brodal P, Bjaalie JG (1997) Salient anatomic features of the cortico-ponto-cerebellar pathway. *Prog Brain Res* **114**: 227-249

Brodie MS, Lee K, Fredholm BB, Stahle L, Dunwiddie TV (1987) Central versus peripheral mediation of responses to adenosine receptor agonists: evidence against a central mode of action. *Brain Res* **415**: 323-330

Chen JF, Sonsalla PK, Pedata F, Melani A, Domenici MR, Popoli P, Geiger J, Lopes LV, de Mendonca A (2007) Adenosine A2A receptors and brain injury: broad spectrum of neuroprotection, multifaceted actions and "fine tuning" modulation. *Prog Neurobiol* **83**: 310-331

Ciruela F, Casado V, Rodrigues RJ, Lujan R, Burgueno J, Canals M, Borycz J, Rebola N, Goldberg SR, Mallol J, Cortes A, Canela EI, Lopez-Gimenez JF, Milligan G, Lluís C, Cunha RA, Ferre S, Franco R (2006) Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers. *J Neurosci* **26**: 2080-2087

Concas A, Santoro G, Mascia MP, Maciocco E, Dazzi L, Ongini E, Biggio G (1993) Anticonvulsant doses of 2-chloro-N6-cyclopentyladenosine, an adenosine A1 receptor agonist, reduce GABAergic transmission in different areas of the mouse brain. *J Pharmacol Exp Ther* **267**: 844-851

Coney AM, Marshall JM (1998) Role of adenosine and its receptors in the vasodilatation induced in the cerebral cortex of the rat by systemic hypoxia. *J Physiol* **509 (Pt 2)**: 507-518

Correia-de-Sá P, Ribeiro JA (1996) Adenosine uptake and deamination regulate tonic A2a receptor facilitation of evoked [3H]acetylcholine release from the rat motor nerve terminals. *Neuroscience* **73**: 85-92

Costenla AR, Lopes LV, de Mendonca A, Ribeiro JA (2001) A functional role for adenosine A3 receptors: modulation of synaptic plasticity in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* **302**: 53-57

Cunha GM, Canas PM, Melo CS, Hockemeyer J, Muller CE, Oliveira CR, Cunha RA (2008) Adenosine A2A receptor blockade prevents memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides but not by scopolamine or MK-801. *Exp Neurol* **210**: 776-781

Cunha RA (2001a) Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem Int* **38**: 107-125

Cunha RA (2001b) Regulation of the ecto-nucleotidase pathway in rat hippocampal nerve terminals. *Neurochem Res* **26**: 979-991

Cunha RA (2005) Neuroprotection by adenosine in the brain: From A(1) receptor activation to A(2A) receptor blockade. *Purinergic Signal* **1**: 111-134

Cunha RA (2008) Different cellular sources and different roles of adenosine: A1 receptor-mediated inhibition through astrocytic-driven volume transmission and synapse-restricted A2A receptor-mediated facilitation of plasticity. *Neurochem Int* **52**: 65-72

Cunha RA, Correia-de-Sa P, Sebastiao AM, Ribeiro JA (1996a) Preferential activation of excitatory adenosine receptors at rat hippocampal and neuromuscular synapses by adenosine formed from released adenine nucleotides. *Br J Pharmacol* **119**: 253-260

Cunha RA, Johansson B, van der Ploeg I, Sebastiao AM, Ribeiro JA, Fredholm BB (1994) Evidence for functionally important adenosine A2a receptors in the rat hippocampus. *Brain Res* **649**: 208-216

Cunha RA, Ribeiro JA (2000) Purinergic modulation of [(3)H]GABA release from rat hippocampal nerve terminals. *Neuropharmacology* **39**: 1156-1167

Cunha RA, Sebastiao AM, Ribeiro JA (1998) Inhibition by ATP of hippocampal synaptic transmission requires localized extracellular catabolism by ecto-nucleotidases into adenosine and channeling to adenosine A1 receptors. *J Neurosci* **18**: 1987-1995

Cunha RA, Vizi ES, Ribeiro JA, Sebastiao AM (1996b) Preferential release of ATP and its extracellular catabolism as a source of adenosine upon high- but not low-frequency stimulation of rat hippocampal slices. *J Neurochem* **67**: 2180-2187

d'Alcantara P, Ledent C, Swillens S, Schiffmann SN (2001) Inactivation of adenosine A2A receptor impairs long term potentiation in the accumbens nucleus without altering basal synaptic transmission. *Neuroscience* **107**: 455-464

de Lanerolle NC, Lee TS (2005) New facets of the neuropathology and molecular profile of human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav* **7**: 190-203

de Mendonça A, Sebastiao AM, Ribeiro JA (1995) Inhibition of NMDA receptor-mediated currents in isolated rat hippocampal neurones by adenosine A1 receptor activation. *Neuroreport* **6**: 1097-1100

De Sarro G, De Sarro A, Di Paola ED, Bertorelli R (1999) Effects of adenosine receptor agonists and antagonists on audiogenic seizure-sensible DBA/2 mice. *Eur J Pharmacol* **371**: 137-145

Deckert J, Morgan PF, Bisslerbe JC, Jacobson KA, Kirk KL, Daly JW, Marangos PJ (1988) Autoradiographic localization of mouse brain adenosine receptors with an antagonist ([3H]xanthine amine congener) ligand probe. *Neurosci Lett* **86**: 121-126

Del Castillo P, Llorente AR, Stockert JC (1989) Influence of fixation, exciting light and section thickness on the primary fluorescence of samples for microfluorometric analysis. *Basic Appl Histochem* **33**: 251-257

Diaz-Hernandez M, Pereira MF, Pintor J, Cunha RA, Ribeiro JA, Miras-Portugal MT (2002) Modulation of the rat hippocampal dinucleotide receptor by adenosine receptor activation. *J Pharmacol Exp Ther* **301**: 441-450

Dixon AK, Gubitz AK, Sirinathsinghji DJ, Richardson PJ, Freeman TC (1996) Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br J Pharmacol* **118**: 1461-1468

Dowson JH (1982) The evaluation of autofluorescence emission spectra derived from neuronal lipopigment. *J Microsc* **128**: 261-270

Dragunow M (1988) Purinergic mechanisms in epilepsy. *Prog Neurobiol* **31**: 85-108

Drury AN, Szent-Gyorgyi A (1929) The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* **68**: 213-237

Dunwiddie TV (1985) The physiological role of adenosine in the central nervous system. *Int Rev Neurobiol* **27**: 63-139

Dunwiddie TV (1999) Adenosine and suppression of seizures. *Adv Neurol* **79**: 1001-1010

Dunwiddie TV, Diao L, Proctor WR (1997) Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *J Neurosci* **17**: 7673-7682

Dunwiddie TV, Haas HL (1985) Adenosine increases synaptic facilitation in the in vitro rat hippocampus: evidence for a presynaptic site of action. *J Physiol* **369**: 365-377

Dunwiddie TV, Masino SA (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* **24**: 31-55

Dunwiddie TV, Worth T (1982) Sedative and anticonvulsant effects of adenosine analogs in mouse and rat. *J Pharmacol Exp Ther* **220**: 70-76

During MJ, Spencer DD (1992) Adenosine: a potential mediator of seizure arrest and postictal refractoriness. *Ann Neurol* **32**: 618-624

Ekonomou A, Sperk G, Kostopoulos G, Angelatou F (2000) Reduction of A1 adenosine receptors in rat hippocampus after kainic acid-induced limbic seizures. *Neurosci Lett* **284**: 49-52

El Yacoubi M, Ledent C, Parmentier M, Costentin J, Vaugeois JM (2008) Evidence for the involvement of the adenosine A(2A) receptor in the lowered susceptibility to pentylenetetrazol-induced seizures produced in mice by long-term treatment with caffeine. *Neuropharmacology* **55**: 35-40

El Yacoubi M, Ledent C, Parmentier M, Costentin J, Vaugeois JM (2009) Adenosine A2A receptor deficient mice are partially resistant to limbic seizures. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **380**: 223-232

Engel J, Jr. (2001) A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia* **42**: 796-803

Engel J, Pedley TA (2007) *Epilepsy: a comprehensive textbook*, 2 edn. New York: Lippincott Williams & Wilkins.

Etherington LA, Patterson GE, Meechan L, Boison D, Irving AJ, Dale N, Frenguelli BG (2009) Astrocytic adenosine kinase regulates basal synaptic adenosine levels and seizure activity but not activity-dependent adenosine release in the hippocampus. *Neuropharmacology* **56**: 429-437

Fedorova IM, Jacobson MA, Basile A, Jacobson KA (2003) Behavioral characterization of mice lacking the A3 adenosine receptor: sensitivity to hypoxic neurodegeneration. *Cell Mol Neurobiol* **23**: 431-447

Fellin T, Haydon PG (2005) Do astrocytes contribute to excitation underlying seizures? *Trends Mol Med* **11**: 530-533

Feoktistov I, Biaggioni I (1997) Adenosine A2B receptors. *Pharmacol Rev* **49**: 381-402

Feoktistov I, Goldstein AE, Ryzhov S, Zeng D, Belardinelli L, Voyno-Yasenetskaya T, Biaggioni I (2002) Differential expression of adenosine receptors in human endothelial cells: role of A2B receptors in angiogenic factor regulation. *Circ Res* **90**: 531-538

Fiebich BL, Biber K, Gyufko K, Berger M, Bauer J, van Calker D (1996) Adenosine A2b receptors mediate an increase in interleukin (IL)-6 mRNA and IL-6 protein synthesis in human astrogloma cells. *J Neurochem* **66**: 1426-1431

Fischer S, Sharma HS, Karliczek GF, Schaper W (1995) Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in pig cerebral microvascular endothelial cells and its upregulation by adenosine. *Brain Res Mol Brain Res* **28**: 141-148

Forster E, Zhao S, Frotscher M (2006) Laminating the hippocampus. *Nat Rev Neurosci* **7**: 259-267

Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* **53**: 527-552

Fredholm BB, Chen JF, Cunha RA, Svenningsson P, Vaugeois JM (2005a) Adenosine and brain function. *Int Rev Neurobiol* **63**: 191-270

Fredholm BB, Chen JF, Masino SA, Vaugeois JM (2005b) Actions of adenosine at its receptors in the CNS: insights from knockouts and drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**: 385-412

Fredholm BB, Hokfelt T, Milligan G (2007) G-protein-coupled receptors: an update. *Acta Physiol (Oxf)* **190**: 3-7

Gebicke-Haerter PJ, Christoffel F, Timmer J, Northoff H, Berger M, Van Calker D (1996) Both adenosine A1- and A2-receptors are required to stimulate microglial proliferation. *Neurochem Int* **29**: 37-42

Geiger JD, Fyda DM (1991) Adenosine transport in nervous system tissue. In *Adenosine in the nervous system*, Stone, TW (ed.), pp 1-23. Academic Press, London

Glass M, Faull RL, Bullock JY, Jansen K, Mee EW, Walker EB, Synek BJ, Dragunow M (1996) Loss of A1 adenosine receptors in human temporal lobe epilepsy. *Brain Res* **710**: 56-68

Gloor P (1991) Mesial temporal sclerosis: historical background and an overview from a modern perspective. In *Luders H (Ed) Epilepsy Surgery*, pp 6889-6703. Raven Press, New York

Grant MB, Davis MI, Caballero S, Feoktistov I, Biaggioni I, Belardinelli L (2001) Proliferation, migration, and ERK activation in human retinal endothelial cells through A(2B) adenosine receptor stimulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**: 2068-2073

Grant MB, Tarnuzzer RW, Caballero S, Ozeck MJ, Davis MI, Spoerri PE, Feoktistov I, Biaggioni I, Shryock JC, Belardinelli L (1999) Adenosine receptor activation induces vascular endothelial growth factor in human retinal endothelial cells. *Circ Res* **85**: 699-706

Gray EG, Whittaker VP (1962) The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *J Anat* **96**: 79-88

Greene RW, Haas HL (1991) The electrophysiology of adenosine in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* **36**: 329-341

Halassa MM, Fellin T, Takano H, Dong JH, Haydon PG (2007) Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J Neurosci* **27**: 6473-6477

Hammarberg C, Schulte G, Fredholm BB (2003) Evidence for functional adenosine A3 receptors in microglia cells. *J Neurochem* **86**: 1051-1054

Haselkorn ML, Shellington DK, Jackson EK, Vagni VA, Janesko-Feldman K, Dubey RK, Gillespie DG, Cheng D, Bell MJ, Jenkins LW, Homanics GE, Schnermann J, Kochanek PM (2010) Adenosine A1 receptor activation as a brake on the microglial response after experimental traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma* **27**: 901-910

Haydon PG, Carmignoto G (2006) Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev* **86**: 1009-1031

Helme-Guizon A, Davis S, Israel M, Lesbats B, Mallet J, Laroche S, Hicks A (1998) Increase in syntaxin 1B and glutamate release in mossy fibre terminals following induction of LTP in the dentate gyrus: a candidate molecular mechanism underlying transsynaptic plasticity. *Eur J Neurosci* **10**: 2231-2237

Henshall DC, Simon RP (2005) Epilepsy and apoptosis pathways. *J Cereb Blood Flow Metab* **25**: 1557-1572

Higley MJ, Sabatini BL (2010) Competitive regulation of synaptic Ca²⁺ influx by D2 dopamine and A2A adenosine receptors. *Nat Neurosci* **13**: 958-966

Holmes GL, Ben-Ari Y (2003) Seizing hold of seizures. *Nat Med* **9**: 994-996

Israel M, Whittaker VP (1965) The isolation of mossy fibre endings from the granular layer of the cerebellar cortex. *Experientia* **21**: 325-326

James S, Richardson PJ (1993) Production of adenosine from extracellular ATP at the striatal cholinergic synapse. *J Neurochem* **60**: 219-227

Jin S, Fredholm BB (1997) Adenosine A2A receptor stimulation increases release of acetylcholine from rat hippocampus but not striatum, and does not affect catecholamine release. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **355**: 48-56

Johansson B, Halldner L, Dunwiddie TV, Masino SA, Poelchen W, Gimenez-Llort L, Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Wiesenfeld-Hallin Z, Xu XJ, Hardemark A, Betsholtz C, Herlenius E, Fredholm BB (2001) Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 9407-9412

Kasper BS, Stefan H, Buchfelder M, Paulus W (1999) Temporal lobe microdysgenesis in epilepsy versus control brains. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**: 22-28

Klishin A, Lozovaya N, Krishtal O (1995) A1 adenosine receptors differentially regulate the N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate receptor-mediated components of hippocampal excitatory postsynaptic current in a $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -dependent manner. *Neuroscience* **65**: 947-953

Kull B, Ferre S, Arslan G, Svenningsson P, Fuxe K, Owman C, Fredholm BB (1999) Reciprocal interactions between adenosine A2A and dopamine D2 receptors in Chinese hamster ovary cells co-transfected with the two receptors. *Biochem Pharmacol* **58**: 1035-1045

Kust BM, Biber K, van Calker D, Gebicke-Haerter PJ (1999) Regulation of K^{+} channel mRNA expression by stimulation of adenosine A2a-receptors in cultured rat microglia. *Glia* **25**: 120-130

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

Lambert NA, Teyler TJ (1991) Adenosine depresses excitatory but not fast inhibitory synaptic transmission in area CA1 of the rat hippocampus. *Neurosci Lett* **122**: 50-52

Li T, Lan JQ, Boison D (2008) Uncoupling of astrogliosis from epileptogenesis in adenosine kinase (ADK) transgenic mice. *Neuron Glia Biol* **4**: 91-99

Li XX, Nomura T, Aihara H, Nishizaki T (2001) Adenosine enhances glial glutamate efflux via A2a adenosine receptors. *Life Sci* **68**: 1343-1350

Lopes LV, Cunha RA, Kull B, Fredholm BB, Ribeiro JA (2002) Adenosine A(2A) receptor facilitation of hippocampal synaptic transmission is dependent on tonic A(1) receptor inhibition. *Neuroscience* **112**: 319-329

Lopes LV, Cunha RA, Ribeiro JA (1999) Cross talk between A(1) and A(2A) adenosine receptors in the hippocampus and cortex of young adult and old rats. *J Neurophysiol* **82**: 3196-3203

Lopes LV, Rebola N, Pinheiro PC, Richardson PJ, Oliveira CR, Cunha RA (2003) Adenosine A3 receptors are located in neurons of the rat hippocampus. *Neuroreport* **14**: 1645-1648

Loscher W, Potschka H (2002) Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* **301**: 7-14

Lupica CR, Proctor WR, Dunwiddie TV (1992) Presynaptic inhibition of excitatory synaptic transmission by adenosine in rat hippocampus: analysis of unitary EPSP variance measured by whole-cell recording. *J Neurosci* **12**: 3753-3764

Malva JO, Silva AP, Cunha RA (2003) Presynaptic modulation controlling neuronal excitability and epileptogenesis: role of kainate, adenosine and neuropeptide Y receptors. *Neurochem Res* **28**: 1501-1515

Margerison JH, Corsellis JA (1966) Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. *Brain* **89**: 499-530

Masino SA, Dulla CG (2005) Adenosine, glutamate and pH: interactions and implications. *Neurol Res* **27**: 149-152

Meldrum BS, Rogawski MA (2007) Molecular targets for antiepileptic drug development. *Neurotherapeutics* **4**: 18-61

Miller RJ (1991) The control of neuronal Ca²⁺ homeostasis. *Prog Neurobiol* **37**: 255-285

Monopoli A, Conti A, Dionisotti S (1996) Pharmacology of the highly selective A1 receptor agonist 2-chloro-N6 cyclopentyladenosine. *Arzneimittelforschung* **44**: 1305-1312

Moreau JL, Huber G (1999) Central adenosine A(2A) receptors: an overview. *Brain Res Brain Res Rev* **31**: 65-82

Nagy AK, Houser CR, Delgado-Escueta AV (1990) Synaptosomal ATPase activities in temporal cortex and hippocampal formation of humans with focal epilepsy. *Brain Res* **529**: 192-201

Nagy AK, Walton NY, Treiman DM (1997) Reduced cortical ecto-ATPase activity in rat brains during prolonged status epilepticus induced by sequential administration of lithium and pilocarpine. *Mol Chem Neuropathol* **31**: 135-147

Ngai AC, Coyne EF, Meno JR, West GA, Winn HR (2001) Receptor subtypes mediating adenosine-induced dilation of cerebral arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**: H2329-2335

Nicholls DG (1989) Release of glutamate, aspartate, and gamma-aminobutyric acid from isolated nerve terminals. *J Neurochem* **52**: 331-341

Nishizaki T, Nagai K, Nomura T, Tada H, Kanno T, Tozaki H, Li XX, Kondoh T, Kodama N, Takahashi E, Sakai N, Tanaka K, Saito N (2002) A new neuromodulatory pathway with a glial contribution mediated via A(2a) adenosine receptors. *Glia* **39**: 133-147

Noonberg SB, Weiss TL, Garovoy MR, Hunt CA (1992) Characterization and minimization of cellular autofluorescence in the study of oligonucleotide uptake using confocal microscopy. *Antisense Res Dev* **2**: 303-313

Nyce JW (1999) Insight into adenosine receptor function using antisense and gene-knockout approaches. *Trends Pharmacol Sci* **20**: 79-83

Oberheim NA, Tian GF, Han X, Peng W, Takano T, Ransom B, Nedergaard M (2008) Loss of astrocytic domain organization in the epileptic brain. *J Neurosci* **28**: 3264-3276

Ochiishi T, Takita M, Ikemoto M, Nakata H, Suzuki SS (1999) Immunohistochemical analysis on the role of adenosine A1 receptors in epilepsy. *Neuroreport* **10**: 3535-3541

Okada M, Nutt DJ, Murakami T, Zhu G, Kamata A, Kawata Y, Kaneko S (2001) Adenosine receptor subtypes modulate two major functional pathways for hippocampal serotonin release. *J Neurosci* **21**: 628-640

Olney JW, deGubareff T, Sloviter RS (1983) "Epileptic" brain damage in rats induced by sustained electrical stimulation of the perforant path. II. Ultrastructural analysis of acute hippocampal pathology. *Brain Res Bull* **10**: 699-712

Olsson RA, Pearson JD (1990) Cardiovascular purinoceptors. *Physiol Rev* **70**: 761-845

Ongini E, Fredholm BB (1996) Pharmacology of adenosine A2A receptors. *Trends Pharmacol Sci* **17**: 364-372

Phillis JW, Wu PH (1981) The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission. *Prog Neurobiol* **16**: 187-239

Pignataro G, Maysami S, Studer FE, Wilz A, Simon RP, Boison D (2008) Downregulation of hippocampal adenosine kinase after focal ischemia as potential endogenous neuroprotective mechanism. *J Cereb Blood Flow Metab* **28**: 17-23

Porkka-Heiskanen T, Alanko L, Kalinchuk A, Stenberg D (2002) Adenosine and sleep. *Sleep Med Rev* **6**: 321-332

Prince DA, Stevens CF (1992) Adenosine decreases neurotransmitter release at central synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 8586-8590

Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* **50**: 413-492

Ramos-Vara JA (2005) Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol* **42**: 405-426

Ramos-Vara JA, Kiupel M, Baszler T, Bliven L, Brodersen B, Chelack B, Czub S, Del Piero F, Dial S, Ehrhart EJ, Graham T, Manning L, Paulsen D, Valli VE, West K (2008) Suggested guidelines for

immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *J Vet Diagn Invest* **20**: 393-413

Ravizza T, Gagliardi B, Noe F, Boer K, Aronica E, Vezzani A (2008) Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* **29**: 142-160

Rebola N, Canas PM, Oliveira CR, Cunha RA (2005a) Different synaptic and subsynaptic localization of adenosine A2A receptors in the hippocampus and striatum of the rat. *Neuroscience* **132**: 893-903

Rebola N, Lujan R, Cunha RA, Mulle C (2008) Adenosine A2A receptors are essential for long-term potentiation of NMDA-EPSCs at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* **57**: 121-134

Rebola N, Oliveira CR, Cunha RA (2002) Transducing system operated by adenosine A(2A) receptors to facilitate acetylcholine release in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol* **454**: 31-38

Rebola N, Pinheiro PC, Oliveira CR, Malva JO, Cunha RA (2003) Subcellular localization of adenosine A(1) receptors in nerve terminals and synapses of the rat hippocampus. *Brain Res* **987**: 49-58

Rebola N, Rodrigues RJ, Lopes LV, Richardson PJ, Oliveira CR, Cunha RA (2005b) Adenosine A1 and A2A receptors are co-expressed in pyramidal neurons and co-localized in glutamatergic nerve terminals of the rat hippocampus. *Neuroscience* **133**: 79-83

Ribeiro JA, Sebastiao AM, de Mendonca A (2002) Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog Neurobiol* **68**: 377-392

Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* **16**: 675-686

Rudolphi KA, Schubert P, Parkinson FE, Fredholm BB (1992) Adenosine and brain ischemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* **4**: 346-369

Scanziani M, Capogna M, Gähwiler BH, Thompson SM (1992) Presynaptic inhibition of miniature excitatory synaptic currents by baclofen and adenosine in the hippocampus. *Neuron* **9**: 919-927

Schnell SA, Staines WA, Wessendorf MW (1999) Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *J Histochem Cytochem* **47**: 719-730

Scholz KP, Miller RJ (1992) Inhibition of quantal transmitter release in the absence of calcium influx by a G protein-linked adenosine receptor at hippocampal synapses. *Neuron* **8**: 1139-1150

Schwaninger M, Neher M, Viegas E, Schneider A, Spranger M (1997) Stimulation of interleukin-6 secretion and gene transcription in primary astrocytes by adenosine. *J Neurochem* **69**: 1145-1150

Scott ID, Nicholls DG (1980) Energy transduction in intact synaptosomes. Influence of plasma-membrane depolarization on the respiration and membrane potential of internal mitochondria determined in situ. *Biochem J* **186**: 21-33

Semwogerere D, Weeks ER. (2005) Confocol microscopy. In Francis T (ed.), *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, pp. 1-10.

Shin HK, Shin YW, Hong KW (2000) Role of adenosine A(2B) receptors in vasodilation of rat pial artery and cerebral blood flow autoregulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**: H339-344

Shryock JC, Belardinelli L (1997) Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am J Cardiol* **79**: 2-10

Silva CG, Porciuncula LO, Canas PM, Oliveira CR, Cunha RA (2007) Blockade of adenosine A(2A) receptors prevents staurosporine-induced apoptosis of rat hippocampal neurons. *Neurobiol Dis* **27**: 182-189

Spencer DD, Spencer SS, Mattson RH, Williamson PD, Novelly RA (1984) Access to the posterior medial temporal lobe structures in the surgical treatment of temporal lobe epilepsy. *Neurosurgery* **15**: 667-671

Sutula T, Cascino G, Cavazos J, Parada I, Ramirez L (1989) Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Ann Neurol* **26**: 321-330

Szabadics J, Soltesz I (2009) Functional specificity of mossy fiber innervation of GABAergic cells in the hippocampus. *J Neurosci* **29**: 4239-4251

Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K (1997) Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* **276**: 1699-1702

Terman A, Brunk UT (1998) Lipofuscin: mechanisms of formation and increase with age. *APMIS* **106**: 265-276

Tetzlaff W, Schubert P, Kreutzberg GW (1987) Synaptic and extrasynaptic localization of adenosine binding sites in the rat hippocampus. *Neuroscience* **21**: 869-875

Thompson SM, Haas HL, Gahwiler BH (1992) Comparison of the actions of adenosine at pre- and postsynaptic receptors in the rat hippocampus in vitro. *J Physiol* **451**: 347-363

Tian GF, Azmi H, Takano T, Xu Q, Peng W, Lin J, Oberheim N, Lou N, Wang X, Zielke HR, Kang J, Nedergaard M (2005) An astrocytic basis of epilepsy. *Nat Med* **11**: 973-981

Tomé A, Silva H, Cunha RA (2010) Role of The Purinergic Neuromodulation System in Epilepsy. *The Open Neuroscience Journal* **4**: 64-83

Tsutsui S, Schnermann J, Noorbakhsh F, Henry S, Yong VW, Winston BW, Warren K, Power C (2004) A1 adenosine receptor upregulation and activation attenuates neuroinflammation and demyelination in a model of multiple sclerosis. *J Neurosci* **24**: 1521-1529

van Calker D, Biber K (2005) The role of glial adenosine receptors in neural resilience and the neurobiology of mood disorders. *Neurochem Res* **30**: 1205-1217

von Lubitz DK, Ye W, McClellan J, Lin RC (1999) Stimulation of adenosine A3 receptors in cerebral ischemia. Neuronal death, recovery, or both? *Ann N Y Acad Sci* **890**: 93-106

Watanabe T, Morimoto K, Hirao T, Suwaki H, Watase K, Tanaka K (1999) Amygdala-kindled and pentylenetetrazole-induced seizures in glutamate transporter GLAST-deficient mice. *Brain Res* **845**: 92-96

Weber K, Osborn M (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* **244**: 4406-4412

Wetherington J, Serrano G, Dingledine R (2008) Astrocytes in the epileptic brain. *Neuron* **58**: 168-178

Whittaker VP (1965) The application of subcellular fractionation techniques to the study of brain function. *Prog Biophys Mol Biol* **15**: 39-96

WHO. (2005) Atlas: Epilepsy Care in the World.

Wieraszko A, Goldsmith G, Seyfried TN (1989) Stimulation-dependent release of adenosine triphosphate from hippocampal slices. *Brain Res* **485**: 244-250

Wirkner K, Gerevich Z, Krause T, Gunther A, Koles L, Schneider D, Norenberg W, Illes P (2004) Adenosine A2A receptor-induced inhibition of NMDA and GABAA receptor-mediated synaptic currents in a subpopulation of rat striatal neurons. *Neuropharmacology* **46**: 994-1007

Wu LG, Saggau P (1994) Adenosine inhibits evoked synaptic transmission primarily by reducing presynaptic calcium influx in area CA1 of hippocampus. *Neuron* **12**: 1139-1148

Yawo H, Chuhma N (1993) Preferential inhibition of omega-conotoxin-sensitive presynaptic Ca²⁺ channels by adenosine autoreceptors. *Nature* **365**: 256-258

Yoon KW, Rothman SM (1991) Adenosine inhibits excitatory but not inhibitory synaptic transmission in the hippocampus. *J Neurosci* **11**: 1375-1380

Young D, Dragunow M (1994) Status epilepticus may be caused by loss of adenosine anticonvulsant mechanisms. *Neuroscience* **58**: 245-261